

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

CATALYSIS IN CHEMISTRY AND ENZYMOLOGY

WILLIAM P. JENCKS
Professor of Biochemistry
Brandeis University

McGRAW-HILL BOOK COMPANY

NEW YORK ST. LOUIS SAN FRANCISCO LONDON
SIDNEY TORONTO MEXICO PANAMA

1969

В. Дженкс

КАТАЛИЗ В ХИМИИ И ЭНЗИМОЛОГИИ

Перевод с английского

канд. хим. наук К. МАРТИНЕКА

и канд. хим. наук А. ЯЦИМИРСКОГО

Под редакцией

чл.-корр. АН СССР И. В. БЕРЕЗИНА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва 1972

Книга посвящена одному из наиболее актуальных вопросов современной химии и биохимии — катализу низкомолекулярными катализаторами и ферментами. В книге удачно сочетаются принципы как научной монографии, так и учебного пособия. Подробно описаны закономерности электрофильно-нуклеофильного и общего кислотно-основного катализа и их приложения к ферментативным процессам. Рассмотрена обширная группа биохимических процессов с точки зрения их химических механизмов. Специальный раздел отведен прикладным аспектам химической кинетики, важным для выяснения механизмов химических и ферментативных процессов.

Книга предназначена для научных сотрудников — биооргаников, физико-химиков, биохимиков, биофизиков, а также для студентов и преподавателей соответствующих специальностей.

Редакция литературы по химии

Посвящается
Дж. Уолду, Ф. Липману, Р. Вудворду,
Ф. Вестхеймеру и Н. Каплану, каждый
из которых внес свой вклад в этот труд

ПРЕДИСЛОВИЕ

Вряд ли от внимания читателя, просматривавшего американское издание данной книги, ускользнуло бы то обстоятельство, что книга Дженкса написана на основе лекционного курса. Этим объясняются некоторые неточности, отдельные лабораторно-жаргонные выражения и достаточно заметная стилистическая небрежность текста. Но тот же читатель не может не обратить внимания на то, что эта книга по существу является своеобразной энциклопедией современной химической энзимологии. В ней содержится все, или почти все, что должен знать современный исследователь и без чего, как утверждает автор, нет надежды осуществить сколько-нибудь значительный вклад в науку. Можно, конечно, оспаривать последнее утверждение, но это вряд ли принесет существенную пользу. Гораздо полезнее запастись терпением и прочитать эту, в общем трудную книгу. Не всем она будет легко доступна. Понимание ее материала требует хотя бы некоторой начальной подготовки по органической и физической химии. Но даже в том случае, если читатель этой подготовкой не обладает, можно не сомневаться, что польза от этого чтения будет ощутимой и стимулирующей.

Основной особенностью книги Дженкса является обилие обобщений, анализ механизмов реакций и их закономерностей, базирующийся на определенном теоретическом фундаменте химии, хотя некоторые из теоретических предпосылок покажутся современному химику-теоретику слишком качественными и упрощенными. Тем не менее автору удалось свести воедино и четко систематизировать и дать объяснения многочисленным фактам, наблюдениям и явлениям энзимологии. Несмотря на то что многое еще ждет объяснения и количественного описания, читатель получит удовлетворение от «вида и высоты» обширного континента энзимологии, который в наше время перестает быть *terra incognita*.

И. Березин

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА

Ферментативный катализ обусловлен специфическим связыванием одной или нескольких молекул субстрата на каталитическом центре фермента и химическим взаимодействием с этим центром, которое может непосредственно использовать силы связывания для понижения свободной энергии активации катализируемой реакции. Цель настоящего труда — рассмотрение с единых позиций некоторых фактов и принципов, касающихся реакций и взаимодействий в водных растворах и необходимых для понимания механизмов катализа в этом необычном растворителе. Обсуждение будет ограничено главным образом гомогенными ионными реакциями, почти не будет затрагиваться гетерогенный катализ и окислительно-восстановительные реакции. Несмотря на то что в качестве примеров приведены некоторые конкретные ферментативные реакции, главный упор сделан на основные принципы взаимодействия, а не на частные свойства данного фермента по той же причине, по которой многие исследователи полагают, что постижение причин заболевания раком скорее всего будет достигнуто в результате исследования механизмов репликации и дифференциации, а не путем изучения самой раковой ткани. Эти принципы сами по себе также интересны для студентов и исследователей, занимающихся механизмами и катализом неферментативных реакций в водном растворе. Не весь материал данной монографии имеет в настоящее время прямое отношение к ферментативному катализу. Однако он является частью остова и языка знаний, которые возникли за последние годы в результате накопления новых сведений и развития новых взглядов на механизмы химических реакций и которые, хотя бы частично, должны стать основой для понимания ферментативного катализа в будущем. Перефразируя слова Хиндемита, приведенные в конце его книги «Традиционная гармония» [1], можно сказать, что усвоение материала данной книги ничего еще не говорит о творческой способности читателя, но, с другой стороны, даже одаренный энзимолог, который не владеет этим материалом, вряд ли может считаться законченным специалистом.

В основе рассматриваемой монографии лежит семестровый курс «Химия реакций, катализируемых ферментами», но ее можно использовать также для чтения курса в два семестра при подборке соответствующего материала. Желательно, чтобы предварительно или параллельно данному курсу читались курсы по физической и органической химии повышенного типа. Главы, посвященные механизмам связывания малых молекул ферментами и другими соединениями в воде, следуют за главами, в которых рассматриваются собственно механизмы, при помощи которых фермент ускоряет реакции связанных субстратов. При желании можно поменять порядок изложения этого материала (автором был использован и тот, и другой порядок). Курс, читаемый автором, состоит из двух часовых лекций в неделю и одного часового занятия, на котором обсуждается материал, отраженный в главе «Практическая кинетика», и также некоторые примеры приложения кинетики к изучению механизмов реакций. Глава «Реакции карбонильной и ацильной групп» суммирует представления о реакционном механизме, полученные для данного класса реакций разными методами. Эту главу не обязательно включать в курс в том же объеме, что и остальную часть книги; однако

материал этой главы может оказаться полезным для самостоятельного изучения, ссылок и обсуждения.

Предлагаемый труд не является всесторонним и исчерпывающим обзором; скорее это краткое изложение тех принципов и фактов, которые, по мнению автора, должны быть усвоены прежде всего и являются в большей или меньшей степени доказанными в настоящее время. Значительная часть книги, особенно места, касающиеся различных разделов физической химии, относятся к области, в которой автор не считает себя авторитетом. Причина, которая побудила нас включить эти вопросы в данную монографию, — отсутствие единого пособия такого рода для студентов и исследователей, не являющихся специалистами в данной области, и те трудности, которые зачастую связаны с получением полезной информации из подробной и нередко противоречивой специальной периодической литературы. Автор попытался описать факты и принципы, являющиеся основой его собственного мышления, и выявить моменты, не ставшие общепризнанными. В связи с таким подходом и из-за ограниченного объема книги пришлось опустить некоторые важные моменты в решении проблемы. Кроме того, в целях собственного удобства автор для иллюстрации отдельных положений использовал результаты исследований своей лаборатории в большей степени, чем они того заслуживают.

Автору не представляется возможным поблагодарить порознь многочисленных коллег и сотрудников, дискуссии с которыми и полезные замечания которых способствовали улучшению книги. Необходимо, однако, подчеркнуть, что лишь автор является ответственным за выводы и ошибки этого труда. Единственное, о чем сожалеет автор, это то, что он не решился последовать совету одного студента и не озаглавил книгу «Радости катализа» (или другого студента, который предложил обратный порядок слов в этом названии). Автор благодарит владельцев авторских прав, прежде всего Американское химическое общество, за разрешение воспроизвести рисунки из литературы.

Вильям П. Дженкс

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hindemith P.*, Traditional Harmony, Associated Music Publishers, Inc., New York, 1943, p. 118.

ПРИНЯТЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

АМП	— 1-ацетокси-4-метоксипиридиный
АМФ	— аденозинмонофосфат
АДФ	— аденозиндифосфат
АТФ	— аденозинтрифосфат
АФ	— ацетилфосфат
БЦТА	— бромистый цетилтриметиламмоний
ДМФ	— диметилформамид
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНФА	— динитрофенилацетат
ДНХБ	— динитрохлорбензол
КПЗ	— комплекс с переносом заряда
КФА	— карбоксифенилацетат
МКФА	— метилкарбоксифенилацетат
НАДН ₂	— восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
НФ	— нитрофенол
НФА	— нитрофенилацетат
<i>n</i> -НФГ	— нитрофенилгексаноат
ПФ	— пирофосфат
РНК	— рибонуклеиновая кислота
ФА	— фенилацетат
ФМН	— флаavinмононуклеотид
ФМНН ₂	— восстановленный флаavinмононуклеотид
ЭАТГ	— этиловый эфир ацетилтетраглицина
восст.	— восстановитель
окисл.	— окислитель
с.о.с.	— скорость определяющая стадия
am	— аминолиз
app	— кажущаяся
eq	— равновесная
hyd	— гидролиз
obs	— наблюдаемая
tot	— общая
$\nu_{ст}$	— частота полосы поглощения переноса заряда

Механизм катализа

«Предположение о существовании этой новой силы является вредным для прогресса науки, поскольку оно, по-видимому, удовлетворяет человеческий дух и тем самым тормозит дальнейшие поиски».

Либиг, относительно описания катализа Берцелиусом.

«Эта доступная область физиологической химии была создана за письменным столом, и она станет тем более опасной, чем больше гениальности будет затрачено на ее воплощение».

Берцелиус, относительно труда Либига «Органическая химия и ее приложение к физиологии и патологии».

...До сих пор исследователи не осознают до конца, насколько мало известно о механизме, при помощи которого ферменты обеспечивают необычайно высокие и специфические ускорения реакций. Значительный прогресс, который был достигнут при установлении химической природы ферментов и в некоторых случаях также и при объяснении химических реакций, происходящих при катализе, послужил причиной для оптимистических настроений. Однако в настоящее время известны лишь отдельные случаи, когда имеются хотя бы самые приближенные представления о том, какие движущие силы снижают свободную энергию активации (что обеспечивает высокую специфичность) или какая связь существует между катализом и специфичностью в реакциях, катализируемых ферментами. Поэтому, а также для освещения общих путей прогресса науки полезно взглянуть, как далеко ушла наука в некоторых областях и как мало продвинулась в других. Это можно проиллюстрировать представлениями Бейлиса [1], изложенными в его монографии «Природа действия ферментов», опубликованной в 1911 г.:

КАТАЛИЗАТОРЫ — ЭТО ОПРЕДЕЛЕННЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

...Необходимо обратить внимание еще на один момент, прежде чем перейти к рассмотрению особого класса катализаторов — ферментов. Имея в виду некоторые теории о природе ферментов, важно отметить, что все катализаторы, упомянутые в данной главе, — это определенные химические объекты с известным составом и свойствами. Это утверждение до сих пор нельзя распространить ни на один фермент. С другой стороны, нельзя уверенно отрицать определенное химическое строение этих веществ, пока не будет показано, что вещества известного строения могут при одних условиях обладать свойствами ферментов, а при других — без какого-либо изменения их химической природы — быть лишены этих свойств.

ФЕРМЕНТЫ НЕ ЯВЛЯЮТСЯ БЕЛКАМИ

...В целом представляется, что не все ферменты имеют одинаковое химическое строение — факт немаловажный, по-видимому, сам по себе. Можно полагать, что некоторые из них относятся к новому до сих пор неизвестному химической науке классу веществ, содержащих в молекуле азот и углеводный остаток...

Очищенные ферменты, упомянутые выше, были получены в виде достаточно концентрированных растворов, позволяющих обнаружить типичные реакции на белок, если бы им была присуща эта природа. Следовательно, неоднократные утверждения, что ферменты можно обнаружить по их действию в растворах, слишком разбавленных, чтобы дать наиболее чувствительную реакцию на белок, не согласуются с истиной.

(стр. 29)

ФЕРМЕНТЫ КАК СВОЙСТВА

...Если рассмотреть все возможные причины того, что в процессе очистки препарата все в большей и большей степени ослабевают его определенные химические свойства, то получим некоторое подтверждение точки зрения, высказанной де Ягером и Артасом, что ферменты не являются химическими индивидуумами, однако некоторые тела могут придавать им свойства, характерные для ферментов. Таким образом, обсуждаются свойства, а не вещества. Утверждают даже, что это воздействие может передаваться на расстоянии. Эксперименты, которые были предложены в подтверждение такого представления, не являются ни в коем случае убедительными... Похожую теорию предложил недавно Бейрендрехт, согласно которой ферменты действуют как радиоактивные тела и химическая активность ферментов обусловлена радиацией.

(стр. 30, 31)

ВЫВОДЫ

...Тщательное изучение ферментов показывает, что их действие подчиняется обычным законам катализа... Есть основания полагать, что фермент-субстратное «соединение», образование которого в общем считают предпосылкой действия фермента, является по своей природе коллоидно-адсорбционным. Это положение согласуется с экспоненциальным видом зависимости между концентрацией фермента (*sic*) и его активностью.

(стр. 116)

Проблему механизма ферментативного действия обычно делят на две части, рассматривая отдельно специфичность и ускорение реакции. Обсуждение специфичности основывают, как правило, на теории «замка и ключа», причем трудно бывает сказать больше того, что следует из предполагаемой в этой теории структурной комплементарности субстрата и активного центра фермента. Однако специфичность является даже более характерным свойством ферментов (по сравнению с другими катализаторами), чем ускорение каталитической реакции, и придется еще возвращаться к тому, что эти два свойства часто взаимозависимы и неразделимы. Это положение очевидно, если рассматривать разбавленные растворы субстратов, когда молекулы субстрата в результате специфического связывания концентрируются на активном центре фермента, чтобы мог осуществиться каталитический процесс. Связь между этими свойствами ферментативного механизма стано-

вится менее очевидной при концентрации субстратов, достаточной для «насыщения» фермента, однако есть основания полагать, что и в этом случае специфическое взаимодействие между ферментом и субстратом, обусловленное силами связывания, составляет неотъемлемую часть каталитического процесса.

Оценить ферментативное ускорение по сравнению с действием других катализаторов или по отношению к скорости неферментативной реакции в воде довольно трудно. Это связано с тем, что неферментативные реакции протекают часто с неизмеримо малой скоростью при тех же экспериментальных условиях, что и ферментативный катализ. В этом случае можно найти лишь нижний предел ускорения ферментативной реакции, как это иллюстрирует табл. 2 в гл. 1. Кроме того, ферментативные реакции подчиняются, как правило, совершенно иному кинетическому закону, чем скорость неферментативной реакции. Так, трудно сравнивать на разумной основе ферментативную реакцию, протекающую при pH 7 и контролируемую распадом фермент-субстратного комплекса (реакция первого порядка), не зависящим от pH, и процесс распада того же субстрата, катализируемый кислотами и подчиняющийся кинетике реакции второго порядка. Иными словами, ферментативная реакция чаще всего имеет механизм, отличный от того, которому следует неферментативная реакция. Тем не менее нет никаких сомнений, что фермент понижает свободную энергию активации, поскольку свободная энергия активации аналогичного механизма, но без участия фермента является обычно столь высокой, что этот механизм в заметной степени не осуществляется. Однако оценить величину этого понижения трудно.

Часто спрашивают, понижает ли фермент энтальпию или энтропию активации реакции? Этот вопрос очень сложен по тем же причинам, которые были рассмотрены выше, а именно вследствие различий в кинетике и механизме ферментативной и неферментативной реакций, а также потому, что наблюдаемые термодинамические величины искажены изменениями в структуре фермента и сольватационными эффектами и, во всяком случае, они не отображают прямым образом поверхность потенциальной энергии, которую пересекает фермент-субстратный комплекс. Оценить уменьшение энтальпии и свободной энергии активации можно для реакции гидролиза мочевины, катализируемой уреазой. Неферментативный гидролиз не зависит от pH и характеризуется константой скорости первого порядка, равной $4,15 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ при 100°C , и энергией активации $32,7 \text{ ккал/моль}$ (137 кДж/моль) [2]. Гидролиз мочевины, связанной с уреазой в фермент-субстратный комплекс, протекает при $20,8^\circ \text{C}$ и pH 8 с константой скорости первого порядка *, равной $3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$, и с энергией активации примерно 11 ккал/моль (46 кДж/моль) [3], что на 22 ккал/моль (92 кДж/моль) меньше энергии активации неферментативной реакции. Значение константы скорости неферментативной реакции, экстраполированное к $20,8^\circ \text{C}$, составляет $3 \cdot 10^{-10} \text{ с}^{-1}$, и, следовательно, фермент ускоряет реакцию в 10^{14} раз. Такое ускорение соответствует понижению свободной энергии активации на 19 ккал/моль ($79,5 \text{ кДж/моль}$). Не исключено, что ферментативная и неферментативная реакции имеют разные механизмы и поэтому увеличение скорости ферментативного процесса по сравнению с неферментативным (ненаблюдаемым), протекающим по тому же механизму, превышает, возможно, величину 10^{14} .

Проблему установления механизма ферментативного действия можно решать тремя путями: теоретическими построениями, исследованием свойств

* При вычислении приведенного значения константы скорости реакции молекулярный вес фермента принимали равным 483 000. Если же, как это кажется вероятным, каждая молекула фермента содержит более чем один активный центр, то удельную константу скорости для каждого активного центра нужно уменьшить пропорционально их числу.

ферментов и изучением механизмов химических реакций и их катализа. Выводы чистой теории не претерпели сильного развития со времен Бейлиса, хотя теоретические и спекулятивные предположения послужили известным стимулом для экспериментальной работы и широко используются в гл. 5. Дальнейшее решение проблемы ферментативного катализа, безусловно, должно базироваться на развитии химии ферментов и фермент-субстратных комплексов. Однако современное состояние этой области весьма часто не позволяет глубоко и количественно проникнуть в природу движущих сил каталитического процесса. Поэтому решению поставленных вопросов, по-видимому, должно предшествовать развитие третьего подхода. Действительно, для того чтобы понять механизм катализа в ферментативной реакции, необходимо сперва понять механизм неферментативной реакции и установить те пути, по которым реакцию можно ускорить. В связи с этим в настоящее время мы похожи на пьяного, который ползает под фонарем в хорошо освещенном месте в поисках своего ключа, хотя потерял его где-то в темном закоулке.

В дальнейшем будут рассмотрены четыре механизма, которые, как можно ожидать, обуславливают ускорение реакции при действии ферментов: сближение реагентов, ковалентный катализ, общий кислотно-основной катализ и деформирование (напряжения, натяжения, искривления и т. п.) молекулы субстрата и(или) фермента. Как будет показано, не всегда возможно провести строгую границу между этими механизмами; несомненно, каталитическая активность фермента обусловлена не одним простым механизмом. При изложении будет сделан упор прежде всего на те механизмы, о которых имеется больше всего сведений, т. е. главным образом на механизмы неферментативных реакций. Ферментативные реакции, а также и некоторые простые теории будут обсуждаться лишь в тех случаях, когда известно что-либо о движущих силах каталитического процесса или когда к объяснению катализа можно приложить простую теорию без существенных оговорок. Рассмотрение неферментативных, и в еще большей степени ферментативных, реакций носит по необходимости эмпирический и качественный (в лучшем случае полуколичественный) характер. Однако во многих областях катализа намечаются значительные успехи, и поэтому автор не сомневается, что через несколько лет в результате развития науки данная книга устареет.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bayliss W. M.*, The Nature of Enzyme Action, 2d ed., Longmans, Green & Co., Inc., New York, 1911.
2. *Shaw W. H. R.*, *Walker D. G.*, J. Am. Chem. Soc., **80**, 5337 (1958).
3. *Wall M. C.*, *Laidler K. J.*, Arch. Biochem. Biophys., **43**, 299 (1953).

КАТАЛИЗ СБЛИЖЕНИЕМ [1]

Наиболее очевидное средство, при помощи которого фермент может увеличить скорость бимолекулярной реакции, это прежде всего сближение реагирующих молекул на активном центре. При рассмотрении этой проблемы самыми важными являются следующие два вопроса:

1. Какого ускорения реакции можно ожидать в результате сближения реагентов?

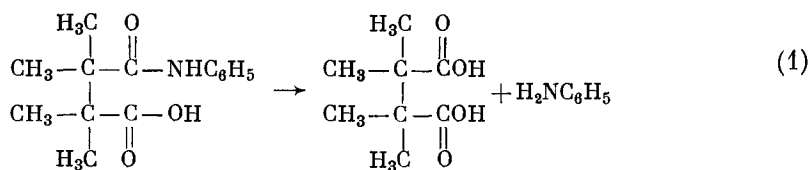
2. Каков механизм ускорения, обусловленный сближением? Удобным подходом к решению первого вопроса является анализ величин ускорения реакций, наблюдаемых в модельных системах, где сближение реагентов произошло либо в результате ковалентного связывания их в пределах одной молекулы, либо под действием слабых сил, приводящих к их обратимому связыванию, аналогично тому, как это происходит при связывании субстратов на ферменте. В настоящее время нельзя дать исчерпывающий ответ на второй вопрос, однако на основании эмпирического использования ряда простых принципов можно высказать предположения о факторах, обеспечивающих ускорение при механизме сближения. •

А. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕАКЦИИ И АНХИМЕРНОЕ СОДЕЙСТВИЕ

1. ПРИМЕРЫ

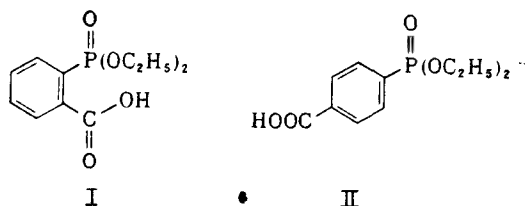
Лучше всего изучены такие модельные системы, в которых реагирующими компонентами являются составные части одной молекулы. Это внутримолекулярные реакции или реакции, в которых функциональная группа, расположенная рядом с реакционным центром, оказывает анхимерное содействие протеканию процесса. Можно предположить, что аналогичное сближение реагирующих групп происходит и на ферменте за счет сил взаимодействия между ферментом и субстратом. В обоих случаях сближение реагентов по сравнению с их состоянием в разбавленном растворе приводит к понижению свободной энергии активации реакции, и, по-видимому, такого рода концентрационный эффект приведет к изменению энтропии активации.

В ряде случаев трудно оценить величину ускорения, обусловленного тем, что реакция протекает внутримолекулярно или с анхимерным содействием, поскольку соответствующие межмолекулярные реакции либо вовсе не идут, либо протекают по другому механизму. Это обстоятельство затруднило анализ ряда известных внутримолекулярных реакций, которые, возможно, характеризуются значительно большим эффектом ускорения. Тем не менее можно указать несколько ярких примеров. Реакция гидролиза полуанилида тетраметилантарной кислоты, протекающая при pH 5 с внутримолекулярным участием карбоксильной группы [уравнение (1)], имеет время полупревращения 30 мин, в то время как оценка времени полупревращения для реакции гидролиза ацетанилида при pH 5 составляет приблизительно 300 лет [2]. Как видно, отношение скоростей этих реакций достигает значения $1,6 \cdot 10^8$. Интересно отметить также, что тетраметилзамещенное соединение [уравнение (1)] подвергается гидролизу в 1200 раз быстрее, чем полуани-



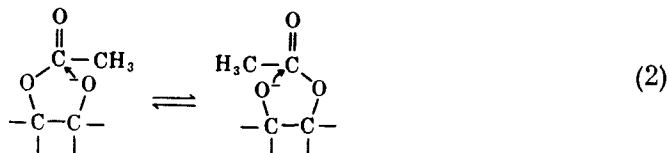
лид незамещенной янтарной кислоты. Это свидетельствует о том, что метильные группы способствуют такому взаиморасположению реакционной и каталитической групп, в результате которого происходит продвижение системы вдоль координаты реакции на 4 ккал/моль (16,8 кДж/моль) по сравнению с незамещенным соединением. Важно отметить, что изменение скорости при переходе от замещенного к незамещенному соединению сопровождается уменьшением энтальпии активации более чем на 6 ккал/моль (25 кДж/моль).

Время полупревращения реакции гидролиза эфира *о*-карбоксифенилфосфорной кислоты (I) в 30%-ном диметилсульфоксиде при 36 °C составляет 15 мин, в то время как при тех же условиях в случаях *пара*-замещенного соединения (II) реакцию гидролиза так и не удалось обнаружить в течение 77 690 ч [3].



Увеличение скорости реакции, обусловленное наличием карбоксильной группы в *орто*-положении, превосходит величину в $7 \cdot 10^7$ раз. Если проэтерифицировать *орто*-карбоксильную группу, то аномальная реакционная способность соединения (I) исчезает. Авторы [3] полагают, что наблюдаемое ускорение обусловлено внутримолекулярным катализом с переносом протона, однако столь большое увеличение скорости реакции позволяет предположить механизм с нуклеофильной атакой соседней карбоксильной группой.

Внутримолекулярный перенос ацильной группы к соседней гидроксильной группе, катализируемый основаниями, протекает значительно быстрее, чем реакции гидролиза или межмолекулярного алколиза. С точки зрения биохимии интересна реакция миграции ацетильной группы между гидроксильными группами в положениях 2' и 3' рибозного остатка О-ацетилиру-



дина (модель аминоксилрибонуклеиновой кислоты). Время полупревращения этой реакции [уравнение (2)] в 0,1 М фосфатном буфере при 20° C составляет 7,5 с, т. е. она протекает в 350 000 раз быстрее, чем межмолекулярный перенос ацетильной группы к окружающим молекулам воды. Время полупревращения последней реакции составляет 30 сут при тех же условиях [4]. Можно не сомневаться, что наблюдаемое различие в скоростях реакций частично обусловлено тем, что гидроксильная группа рибозы легче образует анион, чем вода. Тем не менее вклад, который вносит в увеличение скорости реакции близость соседней к ацетилену гидроксильной группы, должен быть значительным. Миграция протекает существенно быстрее в случае высоко-реакционных аминокислотных производных. Поэтому из раствора, который

находился некоторое время при нейтральном значении рН, невозможно выделить только один изомер аминоксилрибонуклеиновой кислоты. Для известной реакции образования циклических фосфатов из диэфиров нуклеозидфосфатов, катализируемой основаниями, кислотами и рибонуклеазой, также было обнаружено аналогичное увеличение скорости процесса.

Сопоставленные выше меж- и внутримолекулярные реакции нельзя строго считать аналогичными, поэтому важно найти количественную меру эффекта ускорения, наблюдаемого в реакциях с участием одних и тех же реагирующих групп в меж- и внутримолекулярном процессах. Подобное сравнение меж- и внутримолекулярной реакций между реагентами А и В осложнено тем, что межмолекулярная реакция является, как правило, бимолекулярной и ее протекание подчиняется уравнению (3) с константой скорости k_2 , которую можно выразить в единицах л·моль⁻¹·с⁻¹:

$$\text{скорость} = k_2[A][B], \quad (3)$$

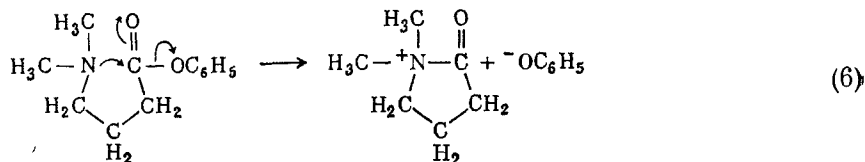
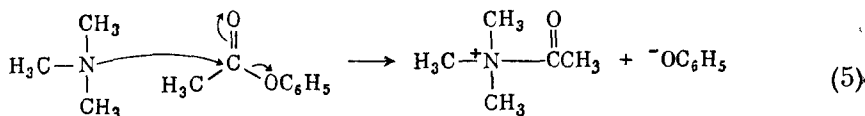
в то время как внутримолекулярная реакция является мономолекулярной и ее скорость следует уравнению (4) с константой скорости k_1 , которую можно выразить в единицах с⁻¹

$$\text{скорость} = k_1[\widehat{AB}]. \quad (4)$$

Отношение k_1/k_2 имеет размерность концентрации, и оно представляет собой молярность избыточного реагента, при которой реакция второго порядка протекает псевдомономолекулярно с константой скорости, численно равной константе скорости внутримолекулярного превращения. Так, если отношение k_1/k_2 равно 5, то реакция А с В при малой концентрации реагентов А и В = 5 М будет характеризоваться константой скорости псевдопервого порядка, равной константе скорости внутримолекулярного превращения соединения $\widehat{AB}$. Следовательно, это отношение можно рассматривать как оценку «эффективной концентрации» компонента В в непосредственной близости от компонента А в молекуле $\widehat{AB}$. Иными словами, отношение k_1/k_2 отражает усредненную концентрацию В около А в молекуле $\widehat{AB}$, если полагать, что эффект ускорения в случае внутримолекулярной реакции полностью обусловлен увеличением локальной концентрации В.

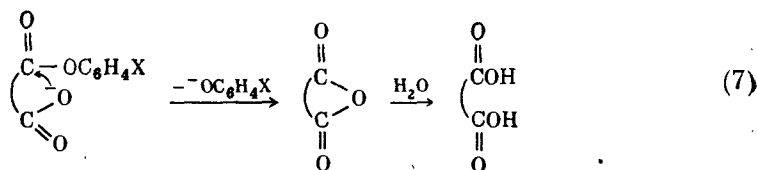
Следует отметить, что числовое значение этого фактора зависит от единиц, в которых представлена концентрация в выражении для константы скорости второго порядка. Тем самым использование шкалы молярности раствора вносит некоторый произвол в сравнение кинетических данных. Поэтому для целей подобного сравнения представляется более удобным выражать концентрацию в мольных долях. В этом случае предельное значение константы скорости второго порядка можно представить как константу скорости псевдопервого порядка для реакции малого количества вещества А, полностью окруженного молекулами В. Если же окажется, что константа скорости для соответствующего внутримолекулярного превращения значительно больше этой величины, то следует полагать, что наблюдаемое увеличение скорости обусловлено другими факторами, чем просто эффектом высокой локальной концентрации. Более подробно к этому вопросу вернемся ниже.

Подобного рода сравнение кинетических характеристик удобно провести на примере реакций нуклеофильного замещения фениловых эфиров с участием аминов и карбоксилат-ионов. Константу скорости второго порядка межмолекулярного аминолиза фенилацетата триметиламином [уравнение (5)] при 20 °С, равную $1,33 \cdot 10^{-4}$ л/моль·с, можно сравнить с константой скорости первого порядка, равной 0,165 с⁻¹ для аналогичной внутримолекулярной реакции фенилового эфира γ-(N,N-диметиламино)-масляной кислоты {уравнение (6)} [5].



Отношение указанных констант скоростей составляет 1250 моль/л. На этом основании можно было бы полагать, что «эффективная концентрация» триалкиламина вблизи ацильной группы в случае внутримолекулярной реакции составляет 1250 моль/л. Однако такая концентрация реально недостижима, и, следовательно, причина высокой скорости внутримолекулярной реакции должна быть приписана также другим факторам, помимо простого эффекта локальной концентрации. Энтальпии активации меж- и внутримолекулярной реакций (5) и (6) почти одинаковы (12,9 и 12,5 ккал/моль, или соответственно 54 и 52,5 кДж/моль), поэтому различие в скоростях этих реакций связано фактически с разностью в энтропийных членах ($T\Delta S^\ddagger$ 3,7 ккал/моль, или 15,5 кДж/моль). Нуклеофилом, эффективно действующим во внутримолекулярных реакциях, является также имидазол [6].

Более подробный анализ влияния структуры на реакционную способность можно провести на ряде замещенных монофениловых эфиров янтарной и глутаровой кислот [7—10]. Механизм гидролиза этих соединений включает внутримолекулярную нуклеофильную атаку ацильной группы карбоксилат-анионом с выделением аниона фенолята и с образованием циклического ангидрида, который на последующей стадии подвергается гидролизу (уравнение (7)). В случае наиболее быстрых реакций можно обнаружить накопление

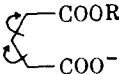
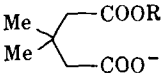
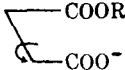
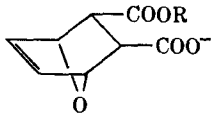


промежуточного ангидрида. Введение в молекулу некоторых структурных элементов, которые придают ей большую жесткость, или же *гем*-диметилзамещение (табл. 1) увеличивают скорость реакции. Эти структурные изменения ограничивают число нереакционноспособных «развернутых» конфигураций молекулы и увеличивают вероятность пребывания реакционных центров вблизи друг друга. Полученные данные позволили сделать вывод [8], что увеличение скорости реакции обусловлено уменьшением числа нереакционных ротамеров молекулы. В соответствии с этой гипотезой для объяснения того факта, что бициклическое соединение (VII) (табл. 1) реагирует в 53 000 раз быстрее, чем монофенилглутарат (III), следует допустить, что лишь $1/53\,000$ доля молекул монофенилглутарата существует в растворе в конформации, которая стерически допускает взаимодействие между ацильной и карбоксильной группами.

Сравнение приведенных констант скоростей внутримолекулярных реакций с соответствующими данными для межмолекулярных реакций осложнено тем, что реакции гидролиза подавляющего большинства фенилацетатов под

Таблица 1

Внутримолекулярные реакции анионов монофениловых эфиров
дикарбоновых кислот [8, 9]

Сложный эфир ^a	Относительная константа скорости гидролиза
^a R = C ₆ H ₅ -или <i>n</i> -BrC ₆ H ₄ -	1,0
III 	20
IV 	230
V 	10 000
VI 	53 000
VII 	

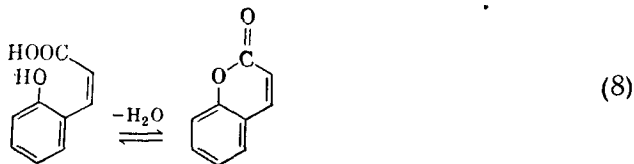
действием ацетата скорее всего протекают по механизму общесосновного катализа, а не путем нуклеофильной атаки с участием карбоксильной группы [11]. Так как константы скорости соответствующих межмолекулярных реакций нуклеофильного замещения должны быть меньше наблюдаемых величин, то в результате сравнения фактически можно получить лишь нижний предел ускорения внутримолекулярных реакций. Такое сравнение показало, что скорости внутримолекулярных реакций с участием *n*-нитрофенилового и фенилового эфиров глутаровой кислоты соответствуют скоростям межмолекулярных реакций *n*-нитрофенил- и фенилацетатов, протекающих в присутствии более чем 30 М или соответственно 600 М ацетата. Если провести сравнение со скоростью реакции бициклического соединения (VII), то ускорение составит величину порядка $600 \times 53\,000 = 3 \cdot 10^7$ М. Столь значительному увеличению скорости соответствует разница в свободных энергиях активации данных реакций, превышающая 10 ккал/моль (42 кДж/моль).

Приведенная оценка характеризует ускорение, которого следует ожидать в реакциях, являющихся моделями ферментативного катализа.

Нуклеофильный катализ, протекающий по рассмотренному механизму замещения с участием карбоксилат-иона, обусловлен наличием легко уходящей группы типа фенолят-иона. Моноэфиры фталевой кислоты претерпевают гидролиз с участием карбоксилата лишь в том случае, если уходящий спирт имеет $pK_a < 13,5$; моноэфиры фталевой кислоты, образованные менее кислыми спиртами, гидролизуются по другому механизму при содействии свободной карбоксильной группы [12].

Различия между внутри- и межмолекулярными реакциями в принципе можно было бы анализировать прямым путем, сравнивая системы, находящиеся в равновесии, где строение как исходных реагентов, так и продуктов известно. Такой подход устранил бы некоторую неопределенность, которая, безусловно, имеет место при сравнении констант скоростей, когда приходится сравнивать строение исходных реагентов с неизвестной структурой переходного состояния. К сожалению, в литературе почти отсутствуют данные для реакций в растворе, которые позволили бы провести такого рода сравнение. Подходящим примером реакции с внутримолекулярным участием карбоксильных групп является гидролиз ангидрида янтарной кислоты, который удобно сравнить с аналогичной реакцией уксусного ангидрида. Свободные энергии этих равновесий, равные приблизительно $-15\,700$ и -8300 кал/моль ($-65,5$ и $-34,8$ кДж/моль) для уксусного и янтарного ангидридов соответственно, различаются на 7400 кал/моль (31 кДж/моль), что превосходит даже разницу в свободных энергиях переходных состояний соответствующих меж- и внутримолекулярной реакций [13–15]. Теплота гидролиза уксусного ангидрида составляет $-14\,000$ кал/моль ($58,5$ кДж/моль) [16, 17]. Теплота гидролиза янтарного ангидрида равна $-11\,200$ кал/моль для твердого состояния [16] и приблизительно -9000 кал/моль ($37,6$ кДж/моль) для реакции в воде [15]. Таким образом, уменьшение свободной энергии гидролиза в случае циклического ангидрида обусловлено в значительной степени менее благоприятной *энтальпией* гидролиза. Значения констант равновесия образования ангидрида возрастают с увеличением степени замещения молекулы метильными группами в ряду производных янтарной кислоты. Эти значения равны $1,0$; $6,0$; $16,5$ и $32 \cdot 10^{-8}$ для незамещенной, метил-, 2,2'-диметил- и 2,3-д,1-диметилянтарной кислот соответственно [15].

Внутримолекулярное образование фенолового эфира по уравнению (8) происходит спонтанно, т. е. с отрицательной свободной энергией [18], в то



время как образование фенилацетата из уксусной кислоты и фенола требует затраты 7390 кал/моль ($30,9$ кДж/моль) [19]. В случае внутримолекулярной, реакции свободная энергия на 7400 кал/моль ($31,0$ кДж/моль) благоприятнее, что близко к величине, приведенной выше для внутримолекулярного образования ангидрида.

Константы равновесия образования пятичленных лактонов из γ -оксимасляной и γ -оксивалериановой кислот, равные $2,7$ и $13,9$, соответствуют свободным энергиям -600 и -1550 кал/моль ($-3,5$ и $-6,5$ кДж/моль). Эти значения¹ можно сравнивать с величиной 1660 кал/моль ($6,95$ кДж/моль), найденной для синтеза этилацетата (прини-

мая в качестве стандартного состояния концентрацию 1 М уксусной кислоты и этанола) [19, 20]. Разница между этими величинами существенно меньше, чем в реакциях, рассмотренных выше.

2. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

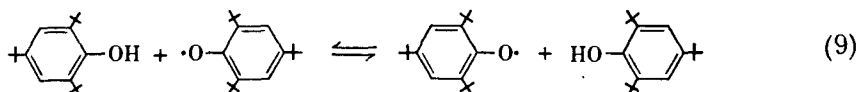
Для осуществления реакции между двумя молекулами в растворе прежде всего необходимо, чтобы произошло их столкновение при правильной взаимной ориентации. Для дальнейшего образования переходного состояния необходимо, чтобы произошли сольватационные изменения, были преодолены вандерваальсовы силы отталкивания и изменился характер перекрывания электронных орбиталей. Важно установить, какой вклад вносит каждый из этих факторов в ускорение процесса, наблюдаемое во внутримолекулярных реакциях; можно полагать, что аналогичные эффекты ускорения будут проявляться и в ферментативных реакциях.

Предельного увеличения частоты столкновений, обусловленного увеличением локальной концентрации реагентов, можно ожидать, если один из реагентов будет полностью окружен молекулами второго вещества. Как было отмечено ранее, величину этого фактора можно оценить, выражая константы скорости и равновесия по отношению к стандартному состоянию, которое дано в мольных долях, вместо стандартного состояния 1 М. В водных растворах значение концентрационного фактора составляет 55 М, что соответствует примерно 8 энтр. ед. или 2400 кал/моль (10 кДж/моль) при 25 °С. Эта величина близка к наблюдаемой на опыте разнице в свободных энергиях образования лактона и сложного эфира, отнесенной к стандартному состоянию 1 М как для кислоты, так и для спирта. Поэтому более благоприятное значение константы равновесия при образовании лактона по сравнению со сложным эфиром следует объяснить за счет увеличения эффективной локальной концентрации кислоты и спирта в оксикислоте, т. е. фактически можно полагать, что менее благоприятная свободная энергия бимолекулярного образования сложного эфира отражает потерю энтропии, обусловленную связыванием в одну частицу двух молекул реагентов (по отношению к стандартному состоянию 1 М каждого из компонентов). Таким же образом можно объяснить увеличение скорости многих других внутримолекулярных реакций по сравнению с их межмолекулярными аналогами.

Очевидно, это объяснение (основанное лишь на положении о высокой локальной концентрации реагентов во внутримолекулярных реакциях) не является всеобъемлющим. Так, разница в свободных энергиях образования ангидридов янтарной и уксусной кислот в три раза превышает оценку, которая следует из анализа концентрационного эффекта. Несостоятельность концепции концентрационного эффекта при объяснении этого различия становится очевидной даже на основании качественного рассмотрения следующего факта. В равновесии с ледяной уксусной кислотой невозможно обнаружить даже следов уксусного ангидрида, в то время как янтарный ангидрид, находящийся в равновесии с янтарной кислотой хотя и в малой концентрации, все же может быть обнаружен даже при большом избытке воды [14]. Не вызывает также сомнений, что «эффективные концентрации» амина и карбоксилат-аниона, найденные для реакций (6) и (7) равными 1250 и $3 \cdot 10^7$ М соответственно, не отражают простого концентрационного эффекта. Для объяснения ускорений внутримолекулярных реакций, превышающих значение, которое следует из «эффективной концентрации» порядка 55 М (или соответственно для ускорений, больших, чем следовало бы из понижения свободной энергии активации на 2400 кал/моль), нужно искать другие причины.

Рассмотрим несколько реакций, для которых можно ожидать значительных эффектов ускорения, если их проводить по внутримолекулярному

механизму, обеспечивающему благоприятную *ориентацию* реагентов, закрепленных в реакционном положении. Энтальпия активации реакции переноса атома водорода от стерически затрудненного *три-трет*-бутилфенола и подобных соединений к соответствующим кислородсодержащим свободным радикалам [уравнение (9)] составляет в четыреххлористом углероде лишь



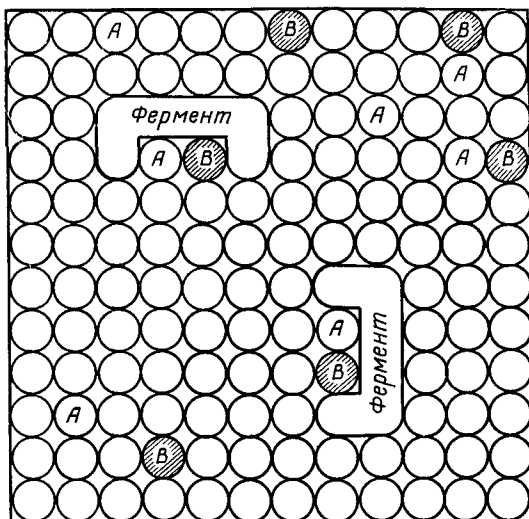
1—2 ккал/моль (4,2—8,4 кДж/моль), в то время как $\Delta S^\ddagger$ достигает примерно —40 энтр. ед. [21]. Кинетический барьер в этих реакциях ($k = 200$ л/моль·с) обусловлен главным образом неблагоприятным энтропийным членом, который большей частью связан с наличием жестких ориентационных и стерических требований, предъявляемых к строению переходного состояния, возникающего из стерически затрудненных реагентов. Реакции многих ацильных соединений в воде также протекают с большой отрицательной энтропией активации, которая превышает в некоторых случаях —50 энтр. ед. Возможно, что причиной высокого энтропийного барьера таких реакций являются не жесткие стерические и ориентационные требования, предъявляемые к нуклеофилу и ацилпроизводному, а скорее ограничения, связанные с ориентацией и электрострикцией большого числа молекул сольватной оболочки, часть из которых выступает в роли катализаторов переноса протона. На примере реакций с переносом ацильной группы особенно удобно рассмотреть полифункциональный катализ, в котором ряд каталитически активных молекул и групп правильно расположен (ориентирован) на активном центре фермента или синтетического катализатора так, что реакция может протекать без большой потери энтропии, которая потребовалась бы для ориентации отдельных молекул катализаторов в растворе. Реакции замыкания гибкой молекулы в цикл отличаются неблагоприятным изменением энтропии, обусловленным потерей внутреннего вращения. Следует ожидать, что образование переходного состояния, которое аналогичным образом связано с потерей внутренних вращательных степеней свободы, также характеризуется неблагоприятной энтропией. Так, энтропия циклогексана на 21 энтр. ед. меньше величины, характеризующей изомер с открытой цепью — гексен-1 [22]. В газовой фазе каждой степени свободы внутреннего вращения соответствуют 5—6 энтр. ед., однако в растворе потеря энтропии, соответствующая замораживанию такого вращения, а также потере степеней свободы поступательного движения, характеризуется существенно меньшими значениями [23].

Для подавляющего большинства реакций ориентационные требования не столь важны, чтобы обеспечение благоприятной ориентации могло привести к большому ускорению процесса. Значение вероятностного фактора теории столкновений, наблюдаемое для большого числа более или менее «обычных» реакций, позволяет заключить, что каждое десятое или сотое * столкновение частиц, обладающих необходимой энергией активации, приводит к реакции, что находится в согласии с химической интуицией и рассмотрением молекулярных моделей. По мнению автора, ускорения реакций, наблюдаемые во внутримолекулярных процессах, являются столь большими, что они не могут быть объяснены благоприятной взаимной ориентацией

* Вопрос об эффективности соударений в жидкофазных реакциях заслуживает более внимательного рассмотрения. Анализ литературы приводит, в частности, к выводу, что в жидкофазных бимолекулярных реакциях нередко стерические факторы, равные 10^{-3} — 10^{-6} , что соответствует одному эффективному соударению из тысячи — миллиона соударений молекул, обладающих необходимым для реакции запасом кинетической энергии. — *Прим. ред.*

реагирующих компонентов (или наличием высокой концентрации реакционноспособных ротамеров).

Аналогичный подход к решению этого вопроса в приложении к ферментативным реакциям был развит Кошландом. При расчете он исходил из того, что максимальному увеличению скорости реакции соответствуют концентрации реагентов на активном центре, столь же большие, как и в растворе, состоящем из одних только реагирующих молекул. Таким образом, в модели Кошланда [24] концентрации реагирующих молекул А и В на активном центре фермента приняты равными концентрациям чистых веществ А и В. Если допустить, что такие концентрации реагентов существуют на каждом



Р и с. 1. Схематическое представление процесса концентрирования реагирующих молекул А и В из разбавленного раствора на активном центре фермента [25].

активном центре фермента, присутствующего в растворе (рис. 1), то оказывается, что эффект локального концентрирования может вызвать лишь весьма небольшое ускорение реакции. Это связано в основном с тем, что концентрация фермента и соответственно активных центров в растворе является, как правило, столь малой, что локальное увеличение концентрации реагентов не может привести к очень большому увеличению суммарной скорости реакции. Предельные значения скоростей реакций, катализируемых гексокиназой и фосфоорилазой, приведены в табл. 2, где V_0 — верхний

Таблица 2

Сравнение наблюдаемых скоростей реакций, катализируемых ферментами, с данными, вычисленными из теории столкновений [24]

Фермент	Субстрат	Концентрация фермента, экв/л	Наблюдаемая скорость реакции, моль · л ⁻¹ · мин ⁻¹		V_E/V_0 (теоретически)	$\frac{(V_E/V_0)_{\text{эксп}}}{(V_E/V_0)_{\text{теор}}}$
			V_0	V_E		
Гексокиназа	Глюкоза (0,003 М), АТФ (0,002 М)	10^{-7}	$< 10^{-13}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	1,8	$> 7 \cdot 10^9$
Фосфоорилаза	Глюкозо-1-фосфат (0,016 М) Гликоген (10^{-5} М)	$6 \cdot 10^{-8}$	$< 5 \cdot 10^{-15}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	2,5	$> 1,4 \cdot 10^{11}$

предел возможной скорости неэнзиматической реакции (оценка этого значения основана на том, что неэнзиматическую реакцию так и не удалось обнаружить в течение определенного периода времени) и V_E — наблюдаемая скорость ферментативной реакции. Как видно из таблицы, между наблюдаемыми скоростями и величинами, вычисленными в предположении концентрационного эффекта, имеется расхождение в 10^9 — 10^{11} раз. Это расхождение отражает нижний предел величины ускорения, источник которого является иным, чем простой концентрационный эффект.

Если допустить, что реакция возможна лишь при определенном взаимном расположении реагирующих молекул и что при связывании на активном центре фермента реализуется именно эта благоприятная для реакции взаимная ориентация, то ускорение ферментативной реакции может быть несколько большим [25]. Однако, как уже было отмечено выше, для большинства реакций на основании и этого ориентационного эффекта следует ожидать лишь относительно небольшого увеличения скорости.

По мере увеличения числа молекул, которые должны сблизиться, чтобы обеспечить протекание реакции, возрастает также и ускорение, обусловленное эффектом сближения. Реакция с участием двух молекул субстратов и трех молекул катализаторов является процессом пятого порядка и ее скорость определяется уравнением (10):

$$\text{скорость} = k[S_1][S_2][\text{Kat}_1][\text{Kat}_2][\text{Kat}_3], \quad (10)$$

где S — субстрат и Кат — катализатор. Если все пять молекул связать ориентированно на активном центре фермента, то можно ожидать ускорения процесса порядка 10^{13} — 10^{17} раз [25]. Это значительное ускорение; однако следует помнить, что неферментативная реакция пятого порядка является, как правило, столь медленной, что ее совсем нельзя обнаружить экспериментально. Поэтому даже при таком большом ускорении реакция не обязательно должна стать наблюдаемой. При любом сравнении констант скоростей реакций, проводимом подобным образом, необходимо учитывать отличия в порядках реакций так, как это было показано выше для бимолекулярных и мономолекулярных реакций.

Концентрированием и ориентацией реагентов на активном центре фермента особенно трудно объяснить ускорения мономолекулярных реакций или реакций с участием воды в качестве нуклеофильного агента. Концентрация воды не может быть значительно больше той, которая существует в растворе, и, кроме того, трудно представить себе очень жесткие ориентационные требования по отношению к атакующей молекуле воды.

Значительный вклад в ускорение как внутримолекулярных, так и ферментативных реакций могут вносить изменения в сольватации. Так, для образования переходного состояния при атаке карбоксилат-ионом сложного эфира необходимо, чтобы молекулы воды, сольватирующие заряд карбоксилат-иона, были удалены. Рассмотрение молекулярных моделей показывает, что карбоксильная группа сложного эфира VII (табл. 1) не может быть сольватирована водой с той стороны, где происходит атака сложноэфирной группы. Поэтому для данной внутримолекулярной реакции нет дополнительных требований к потере сольватирующей воды в этом положении. Можно полагать, что исходные состояния быстро и медленно реагирующих сложных эфиров не слишком отличаются по суммарной свободной энергии сольватации, поскольку разница в значениях pK является небольшой. Однако увеличение pK моноэфира глутаровой кислоты на 0,5 единицы, наблюдаемое [10] в результате *гем*-замещения объемными заместителями в положении 3, указывает, по-видимому, что при этом возникают затруднения по отношению к сольватации карбоксилатной группы.

Наконец, отметим, что в исходных состояниях соединений, подвергающихся быстрому внутримолекулярному превращению, или также в фермент-

субстратных комплексах могут иметь место эффекты, способствующие преодолению сил отталкивания (сил Ван-дер-Ваальса) или приводящие к благоприятным изменениям в электронных взаимодействиях. На основании больших величин ускорений, наблюдаемых во внутримолекулярных реакциях, можно полагать, что именно эти эффекты являются причиной высоких скоростей как внутримолекулярных, так и ферментативных реакций. Значительная величина ускорений внутримолекулярных реакций указывает на то, что эффекты такого рода ответственны за высокие скорости внутримолекулярных и энзиматических процессов. Вообще говоря, трудно найти строгую границу между эффектами и явлениями, рассмотренными выше. Эти эффекты можно классифицировать как проявления «напряжений или возмущений», и они будут рассмотрены в гл. 5.

Экспериментально установленное ускорение внутримолекулярных и ферментативных реакций можно представить в виде диаграммы, приведенной на рис. 2. Наблюдаемое понижение свободной энергии активации можно интерпретировать как продвижение реагентов вдоль координаты реакции в направлении переходного состояния. Этот сдвиг может быть вызван либо действием фермента, либо его может осуществить сам экспериментатор, если он химически свяжет реагирующие молекулы в одну частицу. Детальная интерпретация таких диаграмм требует, однако, большой осторожности. Общее уменьшение свободной энергии активации обусловлено сближением реагентов при их удалении из разбавленного раствора (этот эффект включает произвольный энтропийный член, который зависит от концентрации раствора), ориентацией реагентов и их десольватацией, а также преодоленным энергетическим барьером реакции. Следует отметить, что наряду со специфическими каталитическими эффектами движущей силой этого процесса являются силы связывания, действующие между ферментом и субстратом.

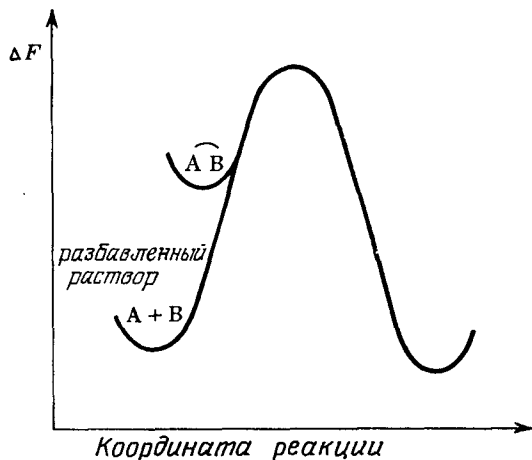


Рис. 2. Энергетический профиль реакции, на котором показано, насколько реагирующие молекулы сдвинуты вдоль координаты реакции, будучи химически связаны между собой (как в случае внутримолекулярной реакции) или при связывании их на активном центре фермента.

3. ЭНТАЛЬПИЯ И ЭНТРОПИЯ

Умозрительно вклад концентрационного и ориентационного эффектов в ускорение внутримолекулярной реакции можно было бы отделить от того вклада, который обусловлен частичным преодолением энергетического барьера реагентами уже в исходном состоянии реакции. Следует полагать, что первый вклад приводит к более благоприятной энтропии активации, а второй обуславливает понижение энтальпии активации внутримолекулярной реакции. Однако, как уже было отмечено выше, высокая скорость внутримолекулярного аминолиза фениловых эфиров обусловлена разностью в энтропии активации, в то время как высокая скорость гидролиза полуанилида тетраметилзамещенной янтарной кислоты, протекающего с внутримолекулярным участием карбоксильной группы, характеризуется неблаго-

приятным изменением энтропии и значительным понижением энтальпии активации по сравнению с реакцией незамещенного соединения. Укажем еще несколько аналогичных примеров. Увеличение скорости лактонизации 2-оксиметилбензойных кислот, наблюдаемое в результате *орто*-замещения, можно объяснить тем, что при введении в молекулу *орто*-заместителей происходит образование конформации, в которой реагирующие группы благоприятно взаимно ориентированы. Однако наблюдаемое увеличение скорости лактонизации связано всецело с энтальпией, но не с энтропией активации [26]. Равновесие гексан — циклогексан в газовой фазе смещается в сторону циклического соединения при введении в молекулу метильных групп. Этот эффект носит как энтропийный, так и энтальпийный характер. Изменение энтальпии этого равновесия объясняют тем, что в случае замещенного гексана при образовании цикла происходит небольшое увеличение числа *гош*-конформаций по сравнению с незамещенным гексаном [27]. Янтарный ангидрид образуется легче, чем уксусный ангидрид, и это обусловлено также более благоприятной энтальпией активации. Очевидно, переход от меж- к внутримолекулярной реакции не сопровождается специфическим изменением одной лишь энтропии или энтальпии активации.

Оценка ожидаемого изменения энтропии, соответствующего взаимному сближению реагирующих молекул, также не приводит к однозначному результату. В качестве модели процесса сближения молекулы воды с ацильным или карбонильным реагентом в переходном состоянии реакции можно рассмотреть равновесную гидратацию альдегидов. Энтропия данного равновесия равна приблизительно —18 энтр. ед. [23]. Найденное значение является более отрицательным, чем можно было бы ожидать. Это указывает на то, что в молекуле гидрата альдегида и в его сольватной оболочке свободное движение больше ограничено, чем в исходных соединениях. Брюс и Бенкович показали, что энтропия активации ряда нуклеофильных реакций с участием фениловых эфиров весьма просто зависит от кинетического порядка реакции, а именно увеличение порядка реакции на единицу приводит к уменьшению члена $T\Delta S^\ddagger$ приблизительно на 5 ккал/моль (20,9 кДж/моль) [28]. Среди примеров, рассмотренных этими авторами, имеется сравнение внутри- и межмолекулярной реакций аминолиза фениловых эфиров глутаровой кислоты, а также сравнение реакций, включающих общесредовой или кислотный катализ, с «некатализируемыми» реакциями. Эти результаты, однако, трудно интерпретировать детально. Так, значение $\Delta H^\ddagger$ для гидразинолиза фенилацетата, катализируемого ионом гидразония (реакция третьего порядка), составляет приблизительно 1 ккал/моль (4,2 кДж/моль). Это меньше, чем величина $\Delta H^\ddagger$ для диффузии в воде, равная 3—4 ккал/моль (12,5—16,7 кДж/моль). Поэтому можно предположить, что существует некоторый компенсирующий процесс, искажающий собственную энтальпию активации вторичным эффектом (например, сольватационным), который приводит к компенсации энтальпийного и энтропийного изменений.

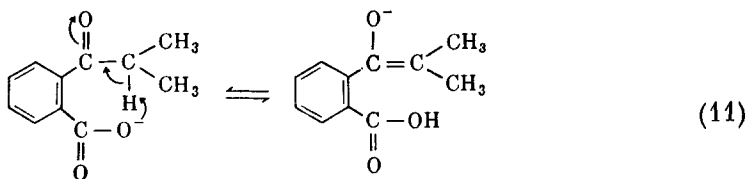
Таким образом, хотя увеличение скорости или благоприятное смещение равновесия внутримолекулярных реакций и сопровождается часто благоприятным изменением энтропии по сравнению с соответствующей межмолекулярной реакцией, нельзя, по-видимому, использовать термодинамические активационные параметры для того, чтобы провести четкую классификацию возможных механизмов, объясняющих наблюдаемые изменения свободной энергии активации в соответствующих реакциях. Это нельзя считать неожиданным, поскольку измеренные экспериментально термодинамические активационные параметры не отражают прямым образом разности потенциальной энергии и энтропии исходных реагентов и переходного состояния. На эти параметры оказывают большое влияние структурные изменения растворителя (сольватационные эффекты), особенно в водном растворе, сопровождающиеся иногда лишь незначительными изменениями свободной энергии.

На этом основании можно полагать, что свободная энергия является часто наиболее разумным критерием, позволяющим судить о свойствах переходного состояния реакции. Вопрос об интерпретации термодинамических параметров обсуждается более широко в гл. 5, разд. Е.

4. ДРУГИЕ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ РЕАКЦИИ

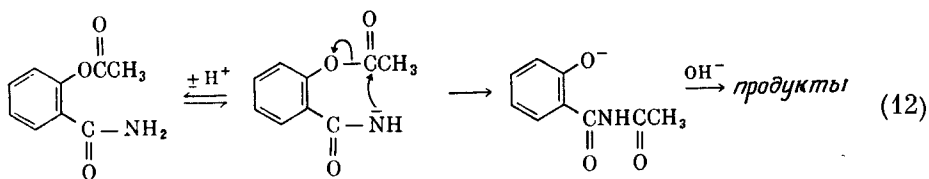
Исчерпывающие обзоры по внутримолекулярным реакциям можно найти в литературе [1]. Поэтому здесь будет рассмотрено лишь несколько особенно интересных примеров.

Енолизация кетона, а именно *o*-изобутирилбензойной кислоты, протекает, по-видимому, по механизму (11) с внутримолекулярным участием



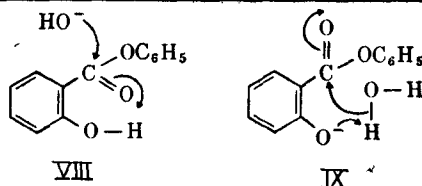
карбоксилат-аниона. Скорость этой реакции примерно такая же, какая была бы в случае межмолекулярной реакции, протекающей в присутствии 50 М карбоксилат-аниона [29]. Это ускорение несколько больше, чем наблюдаемое в случае аналогичной реакции енолизации производного пировиноградной кислоты [30].

Амидные и пептидные группы выступают как активные нуклеофильные агенты (с участием как атомов кислорода, так и азота) лишь во внутримолекулярных реакциях, в то время как в межмолекулярных реакциях они почти не обнаруживают никакой активности [31—33]. Реакция с участием атома азота — это, как правило, промотированная специфическим основным катализом атака сопряженным основанием амида с образованием имида, претерпевающего дальнейший гидролиз с константой скорости, которая может быть как меньше, так и больше константы скорости его образования [уравнение (12)]. Расщепление некоторых β -бензиловых эфиров



аспарагиновых пептидов, приводящее к образованию имида, протекает более чем в миллион раз быстрее, чем реакция гидролиза аналогичных соединений, не содержащих амидной группы. Константа скорости первого порядка реакции образования имида из *O*-ацетилсалициламида [уравнение (12)] более чем в 60 000 раз превосходит константу скорости бимолекулярной реакции амида с фенилацетатом при тех же условиях [31, 33].

Часто бывает трудно различить кинетически эквивалентные альтернативные механизмы внутримолекулярной реакции. Так, гидролиз анионов фенил- и *n*-нитрофенилсалицилатов может протекать либо по механизму атаки ионом гидроксила при участии соседней гидроксильной группы в качестве общекислотного катализатора (VIII), либо под действием воды при участии соседнего фенолят-аниона (IX) как общесосновного катализатора [34, 35]. Скорости реакций, протекающих в соответствии с этими двумя механизмами, можно записать в виде равноценных уравнений (13) и (14),

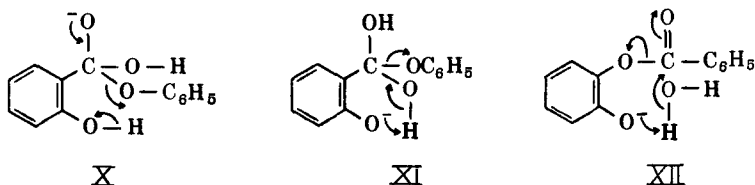


поскольку их можно превратить одно в другое, используя соответствующие выражения для описания равновесия ионизации реагентов:

$$\text{скорость} = k[\text{сложный эфир} - \text{OH}][\text{OH}^-], \quad (13)$$

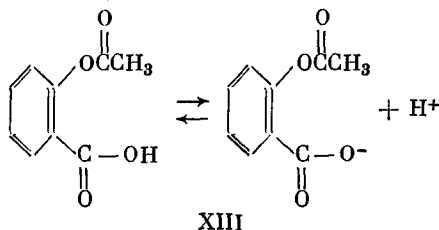
$$\text{скорость} = k'[\text{сложный эфир} - \text{O}^-][\text{HON}]. \quad (14)$$

Очевидно, механизмы VIII и IX нельзя различить кинетически, так как стехиометрический состав и заряд переходных состояний в обоих механизмах тождественны. Механизмы общекислотного и общесосновного катализа реакции распада анионной и соответственно нейтральной форм тетраэдрического продукта присоединения X и XI также приводят к одинаковому выражению для скорости реакции.



Чтобы сделать выбор между этими механизмами, следует изучить данную реакцию, используя в качестве нуклеофила соединение, участие ионной формы которого в реакции было бы не таким неопределенным, как в случае воды, которая может реагировать либо в виде H_2O , либо как OH^- . С использованием этого подхода было установлено, что реакции имидазола, иона азиды и сульфит-иона с *n*-нитрофенилсалицилатом не слишком быстрые. Более того, реакция имидазола с фенилсалицилатом протекает не быстрее, чем реакция с участием фенилового эфира *o*-метоксibenзойной кислоты. На этом основании можно полагать, что как атака нуклеофила (VIII), так и отщепление уходящей фенольной группы (X) не включают общекислотного катализа, поскольку этот механизм должен был бы приводить к ускорению нуклеофильных реакций в такой же степени, как и в случае гидролиза. Следовательно, наиболее приемлемые механизмы — это основной катализ атаки протонированным нуклеофилом (IX) или распад промежуточного продукта присоединения (XI). Ускорение гидролиза *n*-нитрофенилсалицилата является лишь девятикратным по сравнению с реакцией *n*-нитрофенилацетата. Однако в случае фенилсалицилат-аниона реакция протекает в 50 раз скорее по сравнению с фениловым эфиром *o*-метоксibenзойной кислоты. Моноэфир катехина и бензойной кислоты (XII), который может претерпевать гидролиз по аналогичному механизму, реагирует в несколько сот раз быстрее, чем *o*-метоксифенилбензоат.

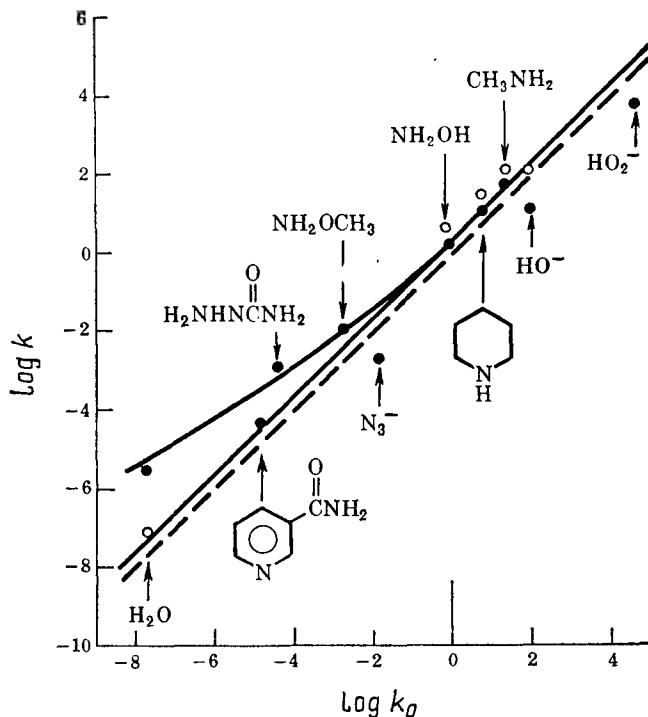
Подобный же прием был использован для установления, какая из ионных форм аспирина (XIII) участвует в реакции с нуклеофилами, протонированной соседней карбоксильной группой [36]



В случае слабоосновных третичных аминов и в случае других соединений, которые должны реагировать в основной форме (N), скорость данной реакции подчиняется уравнению (15):

$$\text{скорость} = k_1[\text{Асп} - \text{COOH}][\text{N}] + k_2[\text{Асп} - \text{COO}^-][\text{N}], \quad (15)$$

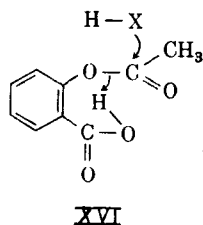
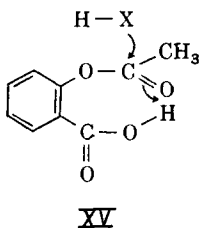
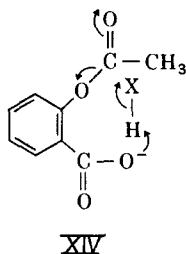
где член, описывающий участие карбоксильной группы (k_1), несколько превышает вклад члена, характеризующего реакцию с участием аниона (k_2).



Р и с. 3. Сравнение констант скоростей второго порядка для реакции ряда нуклеофильных реагентов с фенилацетатом (k_0) с аналогичными данными для реакции тех же соединений с анионом *n*-карбоксифенилацетата (O) и анионом аспирина (•). Пунктирная прямая соответствует зависимости $k = k_0$.

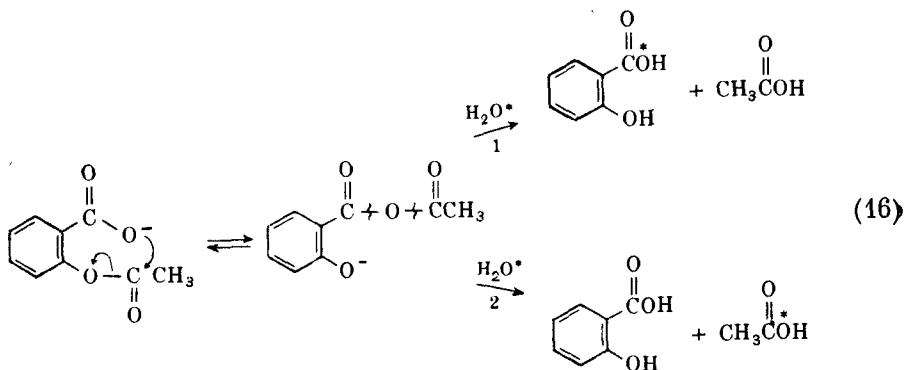
Член с k_2 становится существенным лишь в случае слабоосновных нуклеофилов, содержащих атом водорода, связанный с атакующим атомом азота или кислорода. Наблюдаемое увеличение скорости реакции, обусловленное содействием карбоксильной группы (k_1), недостаточно большое, чтобы можно было на его основании объяснить известную высокую скорость гидролиза аниона аспирина [37] (рис. 12, гл. 11), полагая справедливым кинетически эквивалентный механизм катализа ионом гидроксила реакции гидролиза свободной кислоты. Увеличение скорости реакции гидролиза аниона аспирина на два порядка по сравнению со скоростью гидролиза аниона *n*-карбоксифенилацетата находится в диапазоне значений, который можно предсказать исходя из аналогичных данных, наблюдаемых в реакциях с участием слабоосновных нуклеофилов, содержащих протон, связанный с атакующим атомом (рис. 3). Реакции фенилацетата с водой и семикарбазидом подчиняются механизму межмолекулярного общесредового катализа ацетат-ионом. «Эффективная концентрация» карбоксилат-иона в аспирине, которая проявляется в реакциях, катализируемых этими нуклеофилами, составляет 23—28 М (после поправки на различие в основностях карбокси-

латных групп ацетата и аспирина). Реакции обеих ионных форм аспирина с нуклеофилами протекают, по-видимому, по механизмам внутримолекулярного общекислотного и общекислотного катализа в соответствии со схемами XIV и XV или XVI.



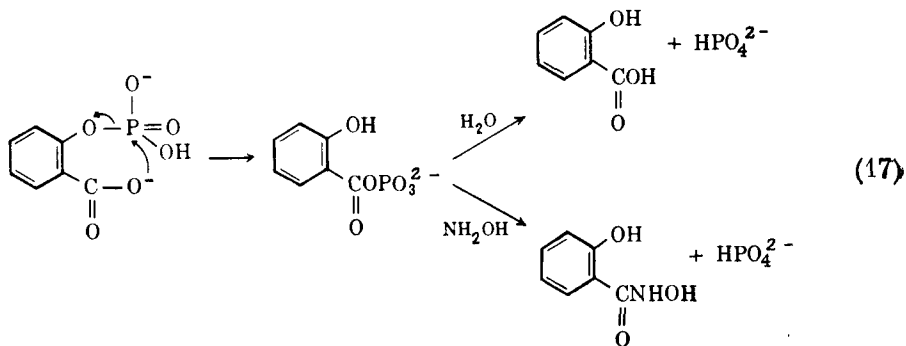
Установленная ранее взаимосвязь между строением и реакционной способностью замещенных аспиринов, а также значения констант скоростей реакций аспирина с кислородсодержащими анионами подтверждают эти механизмы [38].

Если бы гидролиз аспирина протекал по механизму прямой нуклеофильной атаки фенилэфирной группы карбоксилат-анионом с образованием промежуточного ангидрида, то следовало бы ожидать, что при проведении реакции в меченой воде (^{18}O) некоторая часть меченого кислорода в результате гидролиза промежуточного ангидрида будет включаться в карбоксильную группу образующейся салициловой кислоты {уравнение (16)} [39].

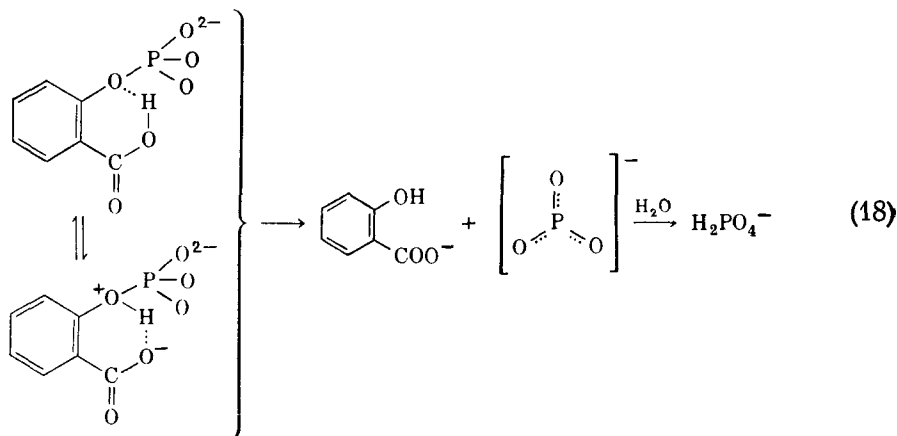


Как было показано, при гидролизе самого аспирина процесс включения не происходит. Это свидетельствует об отсутствии нуклеофильного механизма реакции в случае незамещенного соединения. Меченый кислород, однако, в значительной степени включается в карбоксильную группу в случае 3,5-динитроаспирина, и, следовательно, гидролиз этого соединения протекает через образование ангидрида. Вероятность расщепления связи кислорода с ароматической карбонильной группой достигает при этом 39% {путь 1, уравнение (16)} [38]. Таким образом, гидролиз аспирина подобен межмолекулярной реакции фенилацетатов в том смысле, что карбоксилат-анион катализирует гидролиз сложных эфиров с «хорошей» уходящей группой по механизму прямой нуклеофильной атаки, в то время как реакция гидролиза сложных эфиров с «плохой» уходящей группой, слишком основной, чтобы ее можно было непосредственно удалить под действием карбоксилат-аниона, включает механизм общекислотного катализа нуклеофильной атаки молекулы воды [41].

Дианионы салицилфосфата или других *о*-карбоксиарилфосфатов гидролизуются со скоростью, значительно превосходящей скорость гидролиза *пара*-замещенных соединений, что указывает на ускоряющее влияние *орто*-карбоксильной группы. Механизм этого ускорения может включать либо внутримолекулярную нуклеофильную атаку с образованием ацилфосфата, который затем гидролизуется [уравнение (17)],



либо внутримолекулярный общий кислотно-основной катализ по схеме



Справедливость механизма нуклеофильного катализа [уравнение (17)] можно проверить, проводя реакцию в присутствии соединения, способного активно реагировать с образующимся промежуточным ацилфосфатом. Ацилфосфаты, в том числе салицилфосфат *, быстро взаимодействуют с гидроксиламином с образованием ацилгидроксамовой кислоты; однако при гидролизе салицилфосфата, протекающем в присутствии гидроксилamina, гидроксамовая кислота не образуется [40]. Следовательно, участие в реакции карбоксильной группы сводится к механизму общего кислотно-основного катализа [уравнение (18)] аналогично тому, как это происходит в реакциях кислой формы аспирина. Гидролиз салицилсульфата протекает, по-видимому, по тому же механизму [41].

Вода — это эффективный кислотный и основной катализатор, а также в определенном смысле и хороший растворитель для реакций, протекающих с образованием полярных переходных состояний. Следовательно, ускорения реакции, обусловленные внутримолекулярным общим кислотно-основным

* Смешанный ангидрид салициловой и фосфорной кислот.— Прим. ред.

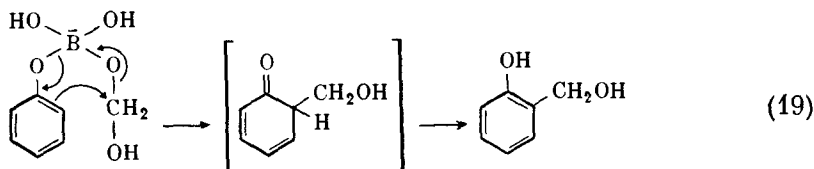
катализом или внутримолекулярной сольватацией переходного состояния, не должны быть столь значительными в воде, как в других растворителях. Особенно эффективно переходное состояние реакции может быть стабилизировано за счет такого катализа в растворителях, не содержащих гидроксильных групп. В литературе по синтетической органической химии описан ряд примеров катализа подобного рода, однако практически ни один из них не изучен количественно. В этой связи можно указать на реакцию, которая включает, по-видимому, как общекислотный, так и осноосновной катализ. Это реакция сольволиза жесткой молекулы алициклического 1,3-диаксильного оксимонацетата в метаноле, которая ускоряется при наличии соседней как amino-, так и гидроксильной групп [42]. В результате сравнения скоростей метанолиза соединений, близких в структурном отношении, но не содержащих соседних окси- и amino-групп, можно заключить, что гидроксильная группа приводит к 40-кратному ускорению, а amino-группа дает добавочное 25-кратное ускорение реакции. При этом можно предположить, что эти ускорения реакции обусловлены некоторого рода общекислотным или соответственно осноосновным катализом.

Гидролиз замещенных фениловых эфиров под действием поли-5-(6)-винилбензимидазола в нейтральном и щелочном растворах протекает со скоростью, которая примерно в 10 раз превышает скорость гидролиза, катализируемого мономерами бензимидазола при тех же условиях. Это позволяет предположить *, что бензимидазольные группы в полимере взаимно увеличивают реакционную способность, взаимодействуя, по-видимому, по механизму полифункционального катализа [43].

Б. ВЫНУЖДЕННОЕ СБЛИЖЕНИЕ

На активном центре фермента происходит сближение реагирующих молекул за счет слабых сил связывания. Поэтому интересно рассмотреть модельные системы, в которых реагирующие молекулы сближаются подобным образом.

Одним из наиболее ярких примеров являются реакции производных боратов, поскольку бораты могут обратимо образовать ковалентные продукты присоединения с гидроксилсодержащими соединениями и скорость этого взаимодействия значительно превышает скорости многих других реакций. В присутствии борной кислоты фенол реагирует с формальдегидом в бензоле, образуя исключительно *о*-оксиметилфенол; в отсутствие борной кислоты при прочих равных условиях образования *орто*-замещенного продукта практически не происходит [44]. Эта реакция должна включать быстрое и обратимое образование комплекса фенола, бората и формальдегида и протекать, возможно, по механизму, соответствующему схеме (19), или (посколь-

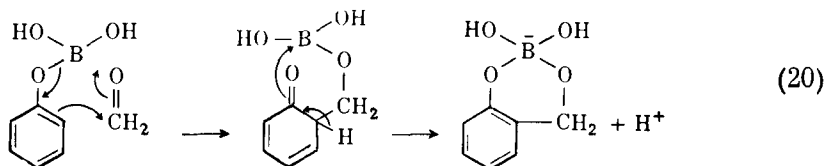


ку реакции с участием карбонильных соединений почти всегда протекают через присоединение к свободному карбонильному соединению, а не через

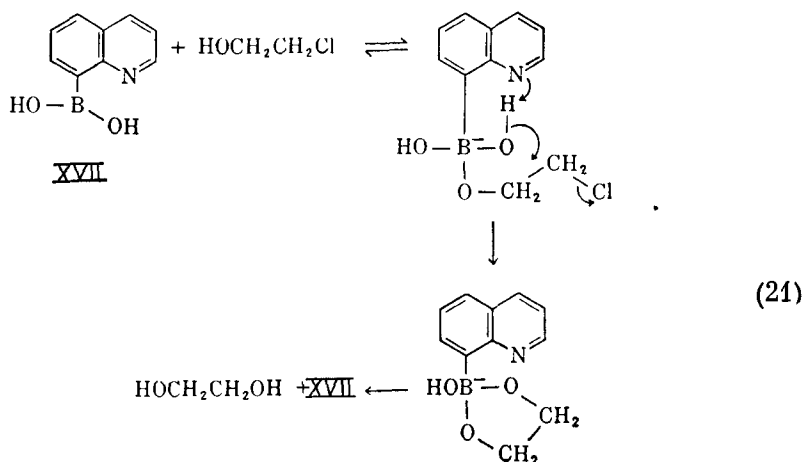
Не исключено, что повышенная реакционная способность бензимидазольной группы в полимере обусловлена экстракцией субстратов из водного раствора в среду полимерной молекулы, как это происходит в реакциях с участием нуклеофила, сорбированного мицеллами детергентов, см. *Yatsimirski A. K., Martinek K., Berezin I. V., Tetrahedron, 27, 2855 (1971).* — *Прим. ред.*

замещение при насыщенном атоме углерода) по механизму, аналогичному схеме (20).

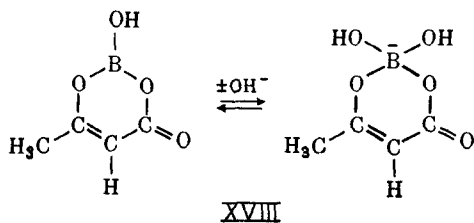
Реакцию оксиметилирования в *орто*-положение специфически катализируют также гидроокиси металлов, например $\text{Cu}(\text{OH})_2$, которые, по-видимому, могут образовывать комплексы, аналогичные по своей структуре боратным комплексам. В воде катализ не идет, и это обусловлено, вероятно, тем, что вода смещает равновесие комплексообразования в неблагоприятную сторону



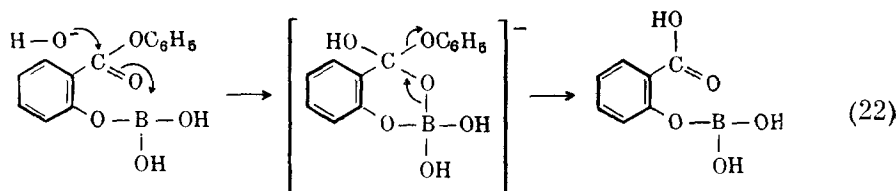
Борсодержащее соединение XVII действует во влажном диметилформамиде как специфический катализатор реакции гидролиза хлорэтанола до этиленгликоля. В отсутствие этого катализатора идет циклизация с образованием окиси этилена по реакции, специфически катализируемой основаниями [45]. В опытах с использованием ряда хлорзамещенных спиртов было установлено, что атом хлора и гидроксильная группа должны находиться в *транс*-положении и что вытеснение хлор-иона протекает с обращением конфигурации. Это значит, что продукт реакции образуется в результате прямой атаки углерода кислородом. Механизм с двойным замещением, в котором за реакцией вытеснения под действием азота происходит замещение водой (и, таким образом, осуществляется второе обращение конфигурации), следует отвергнуть. Так же, как и в реакции, рассмотренной выше, можно предполагать, что образуется промежуточный комплекс и реакция протекает по механизму, подобному схеме (24)



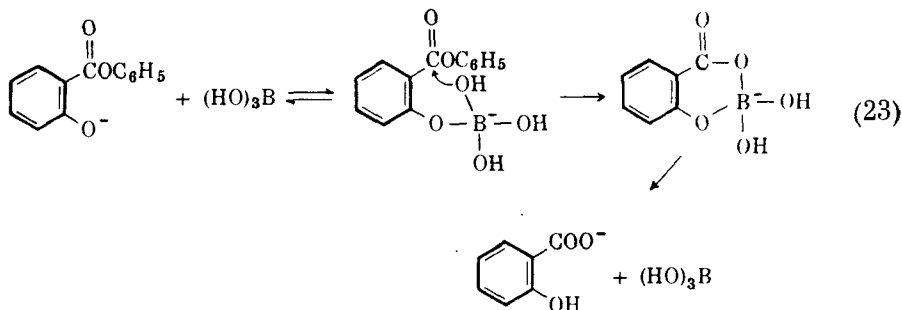
Гидролиз фенилсалицилата в водном растворе, катализируемый боратами, протекает более чем в 100 раз быстрее реакции гидролиза *о*-метоксибензоата. Известно, что борат образует комплекс с салициловой, а также с ацетоуксусной кислотами. В последнем случае происходит сдвиг равновесия в сторону енольной формы, связанной в комплекс (XVIII) [46]. Это позволяет предположить, что реакция гидролиза фенилсалицилата протекает по механизму (22), где борат стабилизирует переходное состояние, подобное тетраэдрическому промежуточному продукту присоединения.



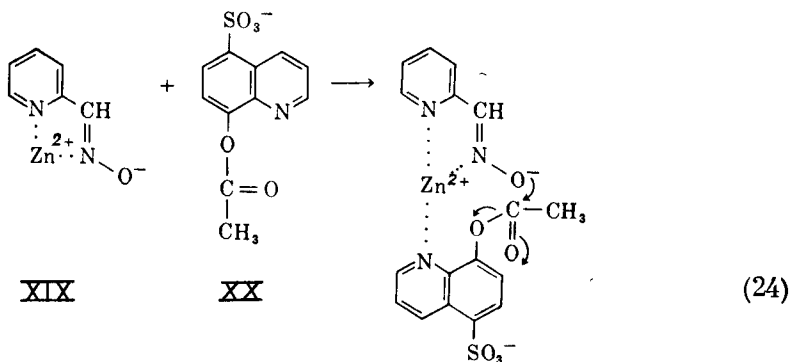
Характер зависимости реакции от pH указывает на то, что бораты катализируют реакцию как с участием молекулы воды, так и с ионом гидроксила



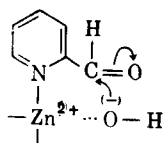
[35, 47]. С другой стороны, борат после присоединения к оксигруппе фенола может выступать в роли внутримолекулярного нуклеофильного катализатора {уравнение (23)} [48].



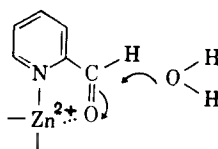
Один из возможных механизмов участия ионов металлов в ферментативных реакциях заключается, как часто полагают, в том, что эти ионы могут поддерживать молекулы субстратов и реакционные группы активного центра фермента в необходимом взаимном пространственном расположении. Реакцию комплекса цинка и пиридин-2-альдоксима (XIX) с ацетоксифинолисульфокислотой (XX) можно рассматривать, по-видимому, как пример неферментативной реакции с переносом ацильной группы в водном растворе, протекание которой облегчается образованием комплекса реагентов с катионом металла [49]. Сложный эфир XX ацилирует комплекс XIX (pK_a 6,5) примерно с той же скоростью, с какой он ацилирует более основной незакомплексованный анион оксима с $pK_a \sim 10$. В то же время *n*-нитрофенилацетат ацилирует комплекс XIX со скоростью, в семь раз меньшей скорости ацилирования незакомплексованного аниона оксима. Повышенную реакционную способность хинолинацетата по отношению к комплексу пиридин-2-альдоксима с цинком следует приписать образованию смешанного комплекса XIX с XX, который стабилизируется взаимодействием иона металла с атомом азота хинолинацетата [уравнение (24)].



Фермент карбоангидраза катализирует реакцию гидратации альдегидов, сложных эфиров, а также и двуокиси углерода. Для проявления ее ферментативной активности необходимо присутствие иона металла, например цинка. Реакцию гидратации пиридин-2-альдегида, катализируемую ионами цинка, можно считать моделью действия этого фермента. Константа скорости второго порядка этой реакции в $6,5 \cdot 10^6$ раз превышает константу скорости реакции с участием только воды [50]. Такое увеличение скорости реакции лишь в 10 раз уступает ускорению ферментативного процесса. Механизм модельной реакции включает, по-видимому, сближение цинка с реагирующим центром, поскольку реакцию гидратации пиридин-4-альдегида цинк катализирует в 280 раз менее эффективно. Реакция представляет собой, вероятно, атаку альдегида молекулой воды, входящей в гидратную оболочку иона цинка, или же ускорение реакции обусловлено поляризацией карбонильной группы ионом металла (как это показано, например, механизмами XXI и XXII)

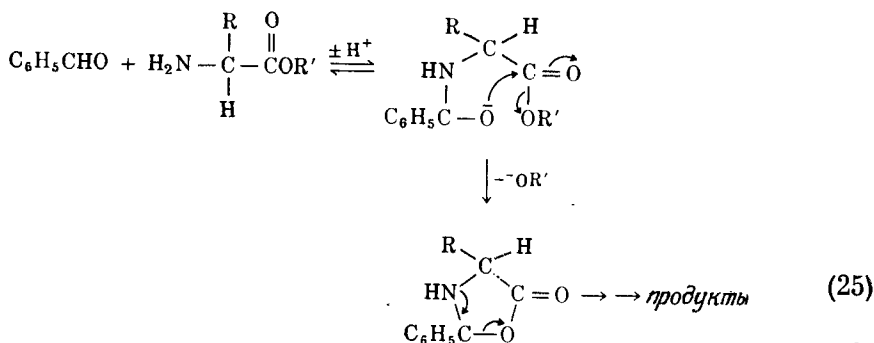


XXI

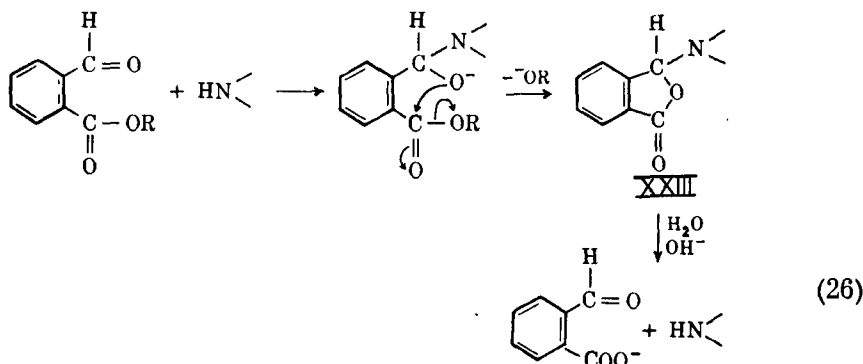


XXII

Бензальдегид (10^{-3} — 10^{-4} М) является эффективным катализатором реакции гидролиза *n*-нитрофенилового эфира лейцина (по активности превышает даже имидазол) [51]. Поскольку молекула слабоосновного бензальдегида — плохой нуклеофил, то кажется вероятным, что механизм катализа представляет собой присоединение бензальдегида к амино-группе сложного эфира с образованием аминокспирта. Такое присоединение приводит к возможности внутримолекулярной атаки сложноэфирной группы кислородом



с образованием лактона, который затем претерпевает быстрый гидролиз путем реакции отщепления [схема (25)]. В соответствии с этим механизмом соединение катализатора с реагирующей молекулой не только переводит межмолекулярную реакцию в режим внутримолекулярного процесса, но приводит также к изменению свойств катализатора, который из нереакционноспособного соединения становится высокоэффективным нуклеофилом. Подобный же механизм обуславливает быстрый гидролиз сложных эфиров *o*-формилбензойной кислоты в присутствии морфолина {уравнение (26)} [52]. В этой реакции спектрофотометрически можно обнаружить накопление промежуточного продукта присоединения — производного морфолина (XXIII)



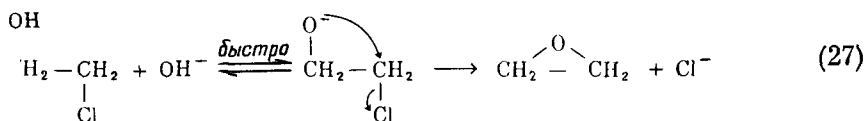
Механизм распада этого промежуточного соединения точно не установлен, но реакция катализируется основаниями и скорость ее не зависит от pH. Сложные эфиры *o*-формилбензойной кислоты и многие другие родственные соединения гидролизуются также очень быстро в щелочной среде; при этом уместно сравнить константу скорости второго порядка щелочного гидролиза *o*-формил-производного, равную приблизительно $2 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·с⁻¹, с величиной, характеризующей гидролиз *n*-формил-замещенного сложного эфира и равной примерно $8 \cdot 10^{-3}$ л·моль⁻¹·с⁻¹. Для объяснения быстрого щелочного гидролиза можно использовать механизм присоединения иона гидроксид-иона к карбонильной группе, в результате которого образуется реакционно-способный продукт присоединения вблизи сложноэфирной связи. Этот механизм является в известном смысле аналогичным тому, который был предложен для реакции, катализируемой морфолином [схема 26)].

1. ЛЕД

Многие исследователи и раньше эпизодически отмечали, что некоторые соединения, будучи стабильными при низкой или даже при комнатной температуре, распадаются, если их хранить в замороженном состоянии. Однако на это интересное явление не слишком обращали внимание до тех пор, пока Грант и другие не сообщили, что пенициллин заметно распадается в замороженных растворах, содержащих имидазольный буфер, хотя в жидких растворах при более высокой температуре он стабилен [53]. Данная работа стимулировала дальнейшее исследование этого явления. Можно считать, что увеличение скорости ряда реакций обусловлено особым механизмом переноса протона во льду, сближением реагентов на поверхности или внутри кристаллической решетки или концентрационными эффектами.

Наиболее значительные и четкие исследования в этой области провели Пинкок и сотрудники, изучившие реакцию, механизм которой в жидкой воде достаточно хорошо установлен. Катализируемый основаниями распад хлорэтанола (10^{-3} М) в присутствии 10^{-3} М основания [уравнение (27)] уско-

ряется во льду в 1000 раз



по сравнению со скоростью реакции в воде при той же температуре [54]. Наблюдаемое увеличение скорости и другие свойства реакции, протекающей во льду, можно количественно объяснить, вычислив концентрацию реагентов в жидких областях льда при использовании известных фазовых зависимостей в данной системе. Большинство чужеродных молекул не может включиться в кристаллическую решетку льда, и поэтому реакция протекает в небольших «лужичах» жидкой фазы, где в результате экстракции воды в окружающий лед реагенты сильно сконцентрированы, что и обуславливает ее ускорение. Таким же образом можно объяснить ускорение катализируемого кислотами процесса мутаротации глюкозы во льду [55]. Нельзя, конечно, исключить возможность существования других, более сложных механизмов ускорения реакций в замороженных растворах хотя бы потому, что в литературе опубликованы некоторые еще не объясненные наблюдения [56]. Однако в настоящее время нет оснований выдвигать какие-либо новые аспекты этой проблемы. Очевидно, прежде чем предполагать более сложные механизмы рассматриваемого явления, следует количественно изучить межфазовые зависимости и концентрационные эффекты в замороженных растворах.

В. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Многие модельные системы обнаруживают специфичность по отношению к субстратам. Разумеется, эта специфичность не является столь тонкой, как специфичность, обнаруживаемая ферментами, тем не менее она имеет близкий характер.

Если приготовление силикагеля вести в присутствии красителей различной структуры, то можно ожидать, что вокруг молекул красителя гель будет формироваться стереоспецифическим образом. После отмывки красителя на этих специфических «центрах» геля могут связываться преимущественным образом молекулы красителя той же структуры. Специфичность связывания была обнаружена для красителей, отличающихся в своей структуре всего лишь на одну CH_2 -группу [57]. В табл. 3 приведена адсорбцион-

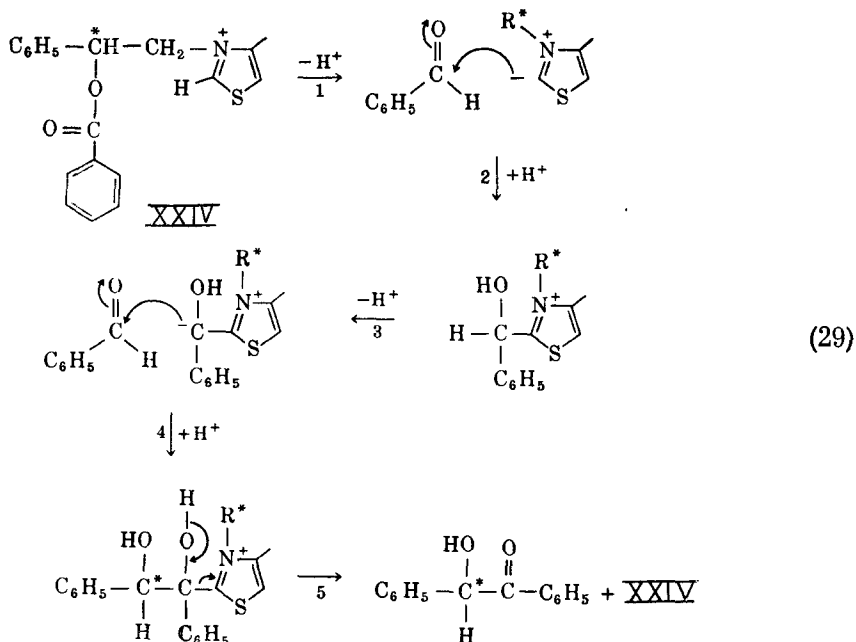
Таблица 3

Специфическая адсорбция красителей на силикагелях [57]

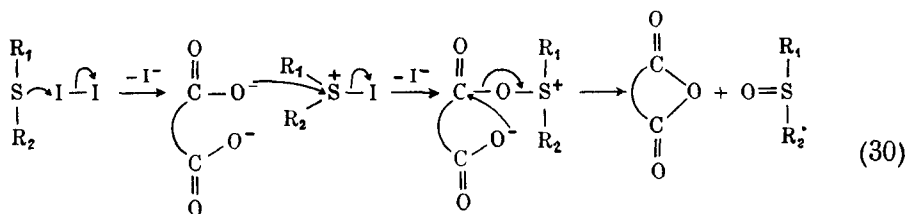
Краситель, присутствующий при приготовлении геля	Относительная адсорбционная способность геля ^а по отношению к красителю			
	метиловому оранжевому	этиловому оранжевому	пропиловому оранжевому	бутиловому оранжевому
Метилловый оранжевый	17	8	3	2
Этиловый оранжевый	9	30	10	3
Пропиловый оранжевый	7	22	30	25
Бутиловый оранжевый	5	13	30	30

^а $0,5 \cdot 10^{-6}$ моль/кг раствора.

чает нуклеофильную атаку сложноэфирной связи имидазольной группой остатка гистидина, входящего в состав катализатора.



Одним из наиболее интересных примеров стереоспецифичности, обнаруживаемой в модельных системах, является окислительная активация карбоксилатов (а также, возможно, и фосфатов), которая происходит при окислении иодом сульфидов до сульфоксидов в почти нейтральном водном растворе [63]. Механизм реакции окисления, катализируемый фталевой кислотой, соответствует, по-видимому, схеме (30), где в качестве промежуточного соединения образуется фталевый ангидрид. При окислении бензилметил-



сульфида в присутствии оптически активного катализатора 2-метил-2-фенил-сукцината образуется оптически активный продукт бензилметилсульфоксид (с оптической чистотой 6%).

Несколько иной тип специфичности проявляют циклодекстрины при химическом взаимодействии с реагентами, с которыми они образуют более или менее специфические соединения включения. *сим,м*-Дихлорфенилпирофосфаты обнаруживают специфичность к размеру кольца циклодекстринов, и они фосфорилируют α -, β - и γ -циклодекстрины с относительной скоростью, равной 15, 100 и 31 соответственно (в присутствии ионов кальция при pH 12) [64]. Значительно бóльшую специфичность по отношению к субстратам обнаруживает циклогексаамилоза в реакции ацилирования замещенными фенилацетатами. В случае комплексов циклогексаамилозы с *м*- и *п*-трет-бутилфенилацетатами скорость реакции характеризуется эффективными константами $13 \cdot 10^{-2}$ и $0,075 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ соответственно [65]. Можно предполо-

жить, что *мета*-замещенный сложный эфир при образовании комплекса входит в полость циклодекстрина так, что ацильная группа находится в благоприятном положении по отношению к гидроксильной группе декстрина. Следует отметить, что константы связывания для обоих сложных эфиров мало отличаются. Об образовании комплекса можно судить на том основании, что скорость реакции стремится к пределу как при увеличении концентрации субстрата, так и декстрина. Интересно сравнить скорости ацилирования, протекающего внутри такого комплекса, с бимолекулярной реакцией ацилирования соответствующего сахара в растворе. В результате можно было бы оценить величину «эффективной концентрации» гидроксильных групп, находящихся в комплексе вблизи реагирующей ацильной группы.

Известны также и другие системы, которые обнаруживают ускорение или специфичность реакции, обусловленную электростатическим или гидрофобным взаимодействием или также взаимодействиями с переносом заряда между реагирующими молекулами и катализатором. Некоторые из таких реакций будут рассмотрены в соответствующих главах, посвященных этим взаимодействиям.

Г. ГЕТЕРОГЕННЫЙ КАТАЛИЗ

Гетерогенный катализ является слишком обширной темой, чтобы можно было охватить ее здесь сколько-нибудь детально. Ряд аспектов гетерогенного катализа имеют прямое отношение к ферментативному катализу: стереоспецифичность гетерогенных реакций, которая зависит от способа присоединения субстрата к катализатору; образование ковалентной связи между субстратами и катализаторами и, наконец, необходимость такого пространственного расположения атомов катализатора, чтобы при связывании субстрата могли возникнуть напряжения и деформации. Химизм катализа металлами отличается от большинства ферментативных реакций, однако несколько примеров гетерогенного катализа, протекающего не на металлах, заслуживают краткого упоминания.

Аденозинтрифосфат (АТФ) адсорбируется на твердом апатите кальция и реагирует затем с остатками фосфата, входящими в кристаллическую решетку. Образовавшийся при этом пирофосфат включается в поверхностный слой кристалла апатита [66]. По-видимому, фосфатные группы АТФ взаимодействуют с доступными ионами кальция на кристаллической поверхности. В результате этого связывания происходит сближение реагирующих фосфатных групп, преодоление электростатического отталкивания, превращение АДФ в хорошую уходящую группу. Не исключено, что протекание реакции облегчается также наведением напряжения в связанную молекулу АТФ. Интересно, что апатит бария, хотя он и связывает АТФ более прочно, в реакции фосфорилирования является менее реакционноспособным. Это свидетельствует, что взаимодействие между кристаллом и нуклеотидом должно быть высокоспецифическим, чтобы способствовать реакции, и зависит, по-видимому, от пространственного расположения атомов в кристаллической решетке апатита.

В присутствии угля сульфо-группа 3-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата переносится на гидроксильную группу гексозоамина с образованием 6-сульфо-производного [67]. Механизм этой реакции, протекающей с низким выходом, не установлен.

При нагревании метилового эфира тетраглицина в растворе при 100 °С происходит межмолекулярный аминолиз с образованием линейного полиглицина. Однако при нагревании твердого вещества при той же температуре идет межмолекулярное алкилирование атома азота с образованием саркозилпептида [68]. Очевидно, силы внутрикристаллического взаимодействия

благоприятствуют реакции алкилирования по сравнению с реакцией ацилирования.

Полимеризация олефинов под влиянием металлических катализаторов происходит с высокой специфичностью, благодаря чему образуются кристаллические полимеры, в которых все мономерные звенья расположены в одинаковой конфигурации [69]. Это значит, что в реакции полимерного синтеза осуществляется стереоспецифическое взаимодействие между растущим полимером, катализатором и реагирующим мономером.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брюс Т., Бенкович С., Механизмы биоорганических реакций, «Мир», М., 1970. Capon B., Quart. Rev., 18, 45 (1964).
2. Higuchi T., Ebersson L., Herd A. K., J. Am. Chem. Soc., 88, 3805 (1966).
3. Gordon M., Notaro V. A., Griffin C. E., J. Am. Chem. Soc., 86, 1898 (1964).
4. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B., Sulston J. E., Trentham D. R., Biochemistry, 5, 3638 (1966).
5. Bruce T. C., Benkovic S. J., J. Am. Chem. Soc., 85, 1 (1963).
6. Schmir G. L., Bruce T. C., J. Am. Chem. Soc., 80, 1173 (1958); Bruce T. C., Sturtevant I. M., ibid., 81, 2860 (1959).
7. Gaetjens E., Morawetz H., J. Am. Chem. Soc., 82, 5328 (1960).
8. Bruce T. C., Pandit U. K., J. Am. Chem. Soc., 82, 5858 (1960).
9. Bruce T. C., Pandit U. K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46, 402 (1960).
10. Bruce T. C., Bradbury W. C., J. Am. Chem. Soc., 87, 4846 (1965).
11. Butler A. R., Gold V., J. Chem. Soc. 1962, 1334; Oakenfull D. G., Riley T., Gold V., Chem. Commun., 1966, 385.
12. Agren A., Hedsten U., Jonsson B., Acta Chem. Scand., 15, 1532 (1961); Ebersson L. ibid., 18, 2015 (1964); Thanassi J. W., Bruce T. C., J. Am. Chem. Soc., 88, 747 (1966).
13. Jencks W. P., Barley F., Barnett R., Gilchrist M., J. Am. Chem. Soc., 88, 4464 (1966).
14. Higuchi T., Miki T., Shah A. C., Herd A. K., J. Am. Chem. Soc., 85, 3655 (1963).
15. Higuchi T., Ebersson L., McRae J. D., J. Am. Chem. Soc., 89, 3001 (1967).
16. Conn J. B., Kistiakowsky G. B., Roberts R. M., Smith E. A., J. Am. Chem. Soc., 64, 1747 (1942).
17. Wadsö I., Acta Chem. Scand., 16, 471 (1962); ibid., 16, 479 (1962).
18. Thanassi J. W., Cohen L. A., J. Am. Chem. Soc., 89, 5734 (1967).
19. Gerstein J., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 86, 4655 (1964).
20. Kailan A., Z. physik. Chem. (Leipzig), 101, 63 (1922).
21. Kreilick R. W., Weissman S. I., J. Am. Chem. Soc., 88, 2645 (1966).
22. Westheimer F. H., Ingraham L. L., J. Phys. Chem., 60, 1668 (1956).
23. Schlager L. L., Long F. A., Advan. Phys. Org. Chem., 1, 1 (1963).
24. Koshland D. E., Jr., J. Cellular Comp. Physiol., 47, suppl. 1, 217 (1956).
25. Koshland D. E., Jr., J. Theoret. Biol., 2, 75 (1962).
26. Bunnett J. F., Hauser C. F., J. Am. Chem. Soc., 87, 2214 (1965).
27. Allinger N. L., Zalkow V., J. Org. Chem., 25, 701 (1960).
28. Bruce T. C., Benkovic S. J., J. Am. Chem. Soc., 86, 418 (1964).
29. Harper E. T., Bende M. L., J. Am. Chem. Soc., 87, 5625 (1965).
30. Albery W. J., Bell R. P., Powell A. L., Trans. Faraday Soc., 61, 1194 (1965).
31. Bernhard S. A., Berger A., Carter J. H., Katchalski E., Sela M., Shalitin Y., J. Am. Chem. Soc., 84, 2421 (1962).
32. Shafer J. A., Morawetz H., J. Org. Chem., 28, 1899 (1963).
33. Behme M. T., Cordes E. H., J. Org. Chem., 29, 1255 (1964).
34. Bender M. L., Kézdy F. J., Zerner B., J. Am. Chem. Soc., 85, 3017 (1963).
35. Capon B., Ghosh B. C., J. Chem. Soc., 1966 B, 472.
36. Pierre T. St., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 90, 3817 (1968).
37. Edwards L. J., Trans. Faraday Soc., 46, 723 (1950); ibid., 48, 696 (1952); Garrett E. R., J. Am. Chem. Soc., 79, 3401 (1957).
38. Fersht A. R., Kirby A. J., J. Am. Chem. Soc., 89, 4853 (1967); ibid., 89, 4857 (1967); ibid., 89, 5960 (1967); ibid., 89, 5961 (1967) and personal communication.
39. Bender M. L., Chloupek F., Neveu M. C., J. Am. Chem. Soc., 80, 5384 (1958).
40. Bender M. L., Lawlor J. M., J. Am. Chem. Soc., 85, 3010 (1963).
41. Benkovic S. J., J. Am. Chem. Soc., 88, 5511 (1966).
42. Kupchan S. M., Eriksen S. P., Friedman M., J. Am. Chem. Soc., 88, 343 (1966); Kupchan S. M., Eriksen S. P., Liang Y.-T. S., ibid., 88, 347 (1966).
43. Overberger C. G., Pierre T. St., Yaroslavsky S., J. Am. Chem. Soc., 87, 4310 (1965).
44. Peer H. G., Rec. Trav. Chim., 79, 825 (1960).

45. Letsinger R. L., Dandegaonker S., Vullo W. J., Morrison J. D., J. Am. Chem. Soc., 85, 2223 (1963); Letsinger R. L., Morrison J. D., *ibid*, 85, 2227 (1963).
46. Neece S., Fridovich I., Arch. Biochem. Biophys., 108, 240 (1964).
47. Tanner D. W., Bruice T. C. J. Am. Chem. Soc., 89, 6954 (1967).
48. Breslow R., personal communication.
49. Breslow R., Chipman D., J. Am. Chem. Soc., 87, 4195 (1965).
50. Pocker Y., Meany J. E., J. Am. Chem. Soc., 89, 631 (1967).
51. Capon B., Capon R., Chem. Commun., 1965, 502.
52. Bender M. L., Reinstein J. A., Silver M. S., Mikulak R., J. Am. Chem. Soc., 87, 4545 (1965).
53. Grant N. H., Clark D. E., Alburn H. E., J. Am. Chem. Soc., 83, 4476 (1961).
54. Pincock R. E., Kiovsky T. E., J. Am. Chem. Soc., 88, 4455 (1966).
55. Kiovsky T. E., Pincock R. E., J. Am. Chem. Soc., 88, 4704 (1966).
56. Grant N. H., Clark D. E., Alburn H. E., J. Am. Chem. Soc., 88 4071 (1966).
57. Dickey F. H., J. Phys. Chem., 59, 695 (1955).
58. Prelog V., Wilhelm M., Helv. Chim. Acta, 37, 1634 (1954).
59. Tsuboyama S., Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 1004 (1962); *ibid*, 38, 354 (1965).
60. Wegler R. Ann. Chem., 506, 77 (1933); Wegler R., Rüber A., Ber., 68B, 1055 (1935); Pracejus H., Ann. Chem., 634, 9 (1960); Bird C. W., Tetrahedron, 18, 1 (1962).
61. Sheehan J. C., Hunneman D. H., J. Am. Chem. Soc., 88, 3666 (1966).
62. Sheehan J. C., Bennett G. B., Schneider J. A., J. Am. Chem. Soc., 88, 3455 (1966).
63. Higuchi T., Gensch K.-H., J. Am. Chem. Soc., 88, 3874 (1966); Higuchi T., Pitman I. H., Gensch K.-H., *ibid*, 88, 5676 (1966).
64. Hennrich N., Cramer F., J. Am. Chem. Soc., 87, 1121 (1965).
65. VanEtten R. L., Sebastian J. F., Clowes G. A., Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 89, 3242 (1967); VanEtten R. L., Clowes G. A., Sebastian J. F., Bender M. L., *ibid*, 89, 3253 (1967).
66. Krane S. M., Glimcher M. J., J. Biol. Chem., 237, 2991 (1962).
67. Adams J. B., Biochim. Biophys. Acta, 62, 17 (1962).
68. Sluyterman L. A. E., Veenendaal H. J., Rec. Trav. Chim., 71, 137 (1952); Sluyterman L. A. E., Kooistra M., *ibid*, 71, 277 (1952).
69. Natta G., J. Pol. Sci., 34, 24 (1959); Natta G., J. Inorg. Nucl. Chem., 8, 589 (1958).

КОВАЛЕНТНЫЙ КАТАЛИЗ

А. ВВЕДЕНИЕ

Некоторые ферменты химически реагируют с субстратами с образованием ковалентносвязанных фермент-субстратных промежуточных соединений. Это открытие больше чем что-либо другое помогло опровергнуть мистические механизмы и виталистические теории ферментативного действия, поскольку оно позволило понять, что механизм ферментативного действия принципиально не отличается от механизма любой другой химической реакции. В частности, именно благодаря ковалентной природе многих фермент-субстратных промежуточных соединений к изучению ферментативных реакций можно было применить методы физико-органической химии, а также и другие химические подходы, которые ранее оказались полезными в поисках объяснения механизмов неферментативных реакций. Быстрый успех, достигнутый при описании ферментативных реакций в рамках химической теории, и плодотворность приложения методов химии к энзимологии дали возникнуть некоторому оптимизму в кругах энзимологов. Стали появляться даже работы, озаглавленные «Механизм действия такого-то фермента...». Однако, несмотря на значительные успехи, которые были достигнуты, необходимо иметь в виду, что понимание механизма и движущих сил, обуславливающих огромные специфические ускорения ферментативных реакций, не является сколько-нибудь детальным или количественным. И хотя нет необходимости возвращаться к витализму, следует помнить, что в ферментативном катализе могут быть заложены важные химические закономерности, которые в настоящее время почти или вообще не поняты.

В табл. 1 приведены ферментативные реакции, для которых с разной степенью достоверности известно, что они протекают через образование

Таблица 1

Некоторые ферментативные реакции

Класс ферментов	Реагирующая группа	Ковалентное промежуточное соединение
Химотрипсин, трипсин, эстеразы, субтилизин, тромбин, эластаза	ОН (серин)	Ацилсерин
Папаин, фицин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	SH (цистеин)	Ацилцистеин
Щелочная фосфатаза, фосфоглюкомутаза	ОН (серин)	Фосфосерин
Сукцинилтиокиназа, фосфоенолпируватогидроксиацетат-трансфераза	Имидазол (гистидин)	Фосфорилимидазол
Альдолазы, декарбоксилазы и пиридоксальные ферменты	$>C=O$ и $>C=N-$ (лизин и аминокислота субстрата)	Основание Шиффа

ковалентных промежуточных соединений фермента и фрагмента субстрата (субстратов). В первую очередь следует указать на протеазы и эстеразы, которые катализируют реакции гидролиза и переноса ацильной группы,

причем в ходе ферментативной реакции происходит промежуточный перенос ацильной группы на гидроксильную или сульфгидрильную группу остатков серина или цистеина, входящих в молекулу фермента. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа катализирует окисление альдегида до «энергетически богатой» сложноэфирной связи, входящей в цистеиновую группу активного центра; затем ацильная группа может быть перенесена на фосфат, чтобы сохранить энергетически богатую связь в виде ацилфосфата. Несколько ферментов, переносящих фосфатный остаток, также образуют промежуточные соединения (фосфорилферменты) с ковалентной связью фосфата с остатком серина или с имидазольной группой остатка гистидина. Некоторые декарбоксилазы, альдолазы и пиридоксальные ферменты образуют ковалентные промежуточные соединения, в которых субстрат связан с ферментом в виде шиффова основания (или, более правильно, в виде имина), что создает в активном центре электрофильную группу, участвующую в катализе. Фактически действие большинства коферментов сводится к промежуточному образованию ковалентных связей между субстратным остатком и коферментом. Принципиально нет особой разницы между ситуацией, когда субстрат реагирует с функциональной группой, ковалентно связанной с ферментом, и ситуацией, когда кофермент связан с белком нековалентно.

Основная проблема ковалентного катализа заключается в выяснении причины, почему реакции выгодно протекать не прямо, а через образование промежуточного соединения с ферментом или коферментом. Разумный ответ на этот вопрос можно найти лишь в некоторых случаях, прежде всего в реакциях с участием коферментов; для многих других систем это пока невозможно, по крайней мере в количественной форме. Прежде чем приступить к анализу этой проблемы, рассмотрим экспериментальные данные, доказывающие, что в реакциях, катализируемых многими ферментами, действительно образуются в качестве промежуточных соединений фермент-субстратные ковалентные соединения.

Б. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ОБРАЗОВАНИЯ КОВАЛЕНТНЫХ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В качестве критериев, доказывающих, что данное фермент-субстратное соединение является ковалентным промежуточным соединением ферментативной реакции, можно выдвинуть следующие:

1. *Выделение.* Необходимо выделить и химически охарактеризовать промежуточное соединение, которое образуется в результате реакции фермента с субстратом.

2. *Кинетика.* Необходимо показать, что это промежуточное соединение образуется и далее реагирует с константами скоростей, которые исчерпывающе могут объяснить наблюдаемую скорость ферментативной реакции. При этом следует убедиться, что это относится к тому самому промежуточному соединению, которое было охарактеризовано в п. 1, т. е. что при выделении промежуточного соединения не произошло его перегруппировки или изомеризации.

3. *Обобщение.* Следует показать, что при использовании хотя бы одного или большего числа «нормальных» субстратов также образуется промежуточное соединение. Дело в том, что первые два из рассматриваемых критериев удается, как правило, реализовать лишь в случае «плохих» субстратов, которые реагируют достаточно медленно, чтобы можно было выделить фермент-субстратное соединение в свободном виде и изучить его стехиометрию. Кроме того, следует учесть, что субстраты, которые сами по себе являются химически высокореакционноспособными веществами, могут реагировать

с ферментом неспецифически, образуя соединения, которые не являются промежуточными соединениями в реакциях специфических субстратов.

Лишь для очень немногих ферментативных реакций (у которых отсутствует быстро устанавливающееся равновесие с коферментом) удалось удовлетворить все перечисленные условия. Особенно трудно измерить скорости образования и дальнейшего превращения промежуточных соединений, которые получаются из нормальных субстратов, поскольку именно эти промежуточные соединения реагируют настолько быстро, что обнаружить их в стехиометрических количествах по отношению к ферменту можно лишь при использовании специальных методов быстрой кинетики. Тем не менее работы по приложению таких методов к ферментативным реакциям уже выполнены, и в ближайшем будущем можно ожидать существенного прогресса в этом направлении. Один из самых первых и ярких примеров использования метода остановленной струи это исследование механизма действия липоилдегидрогеназы [4]. Было показано, что восстановление фермента восстановленной липоевой кислотой до окрашенного промежуточного соединения, по-видимому семихинона, является скоростью определяющей стадией восстановления никотинамид адениндинуклеотида этим субстратом и, следовательно, скорость образования промежуточного соединения адекватна общей скорости катализируемой реакции; скорость определяющей стадией процесса в обратном направлении является восстановление окисленной липоевой кислоты этим же промежуточным соединением.

При отсутствии прямых доказательств того, что ковалентное фермент-субстратное соединение является промежуточным соединением, используют обычно косвенные критерии; некоторые из них будут рассмотрены ниже.

1. НАБЛЮДЕНИЕ ЗА ОБРАЗОВАНИЕМ И ИСЧЕЗНОВЕНИЕМ ПРОМЕЖУТОЧНОГО СОЕДИНЕНИЯ

Хартли и Килби показали, что при гидролизе *n*-нитрофенилацетата (НФА), катализируемом большими количествами химотрипсина, происходит вначале быстрый «выброс» *n*-нитрофенола, за которым следует медленное стационарное образование этого продукта (рис. 1) [2]. Для быстрого выделения продукта в первый момент после смешивания фермента с субстратом можно дать несколько объяснений: а) фермент может подвергаться сильному ингибированию продуктом; это приводит к тому, что после первоначального быстрого образования продукта из фермент-субстратного комплекса [схема (1), константа скорости реакции k_1] в дальнейшем продукт образуется из тройного комплекса фермент-субстрат-продукт с другой, меньшей ско-

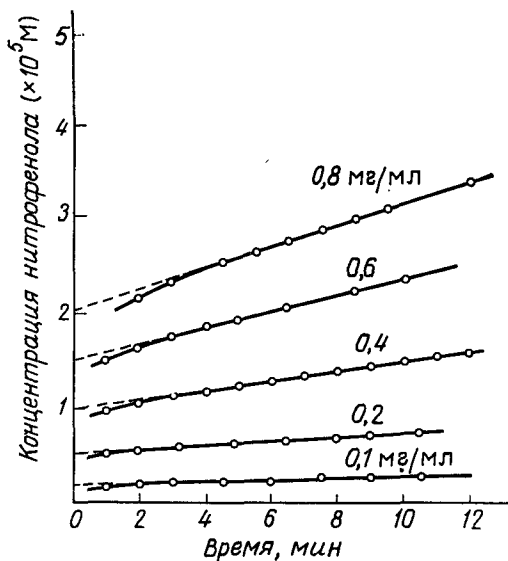
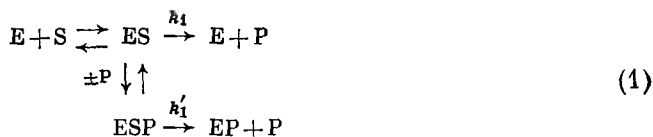
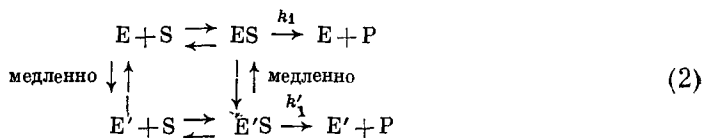


Рис. 1. Первоначальный «выброс» *n*-нитрофенола в реакции *n*-нитрофенилацетата с α -химотрипсином (при большой концентрации фермента). Различные линии соответствуют разным концентрациям α -химотрипсина при $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л *n*-нитрофенилацетата.

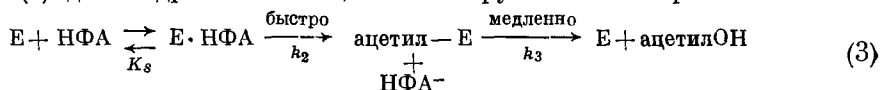
ростью (k'_1);



б) наличие субстрата может приводить к относительно медленному конформационному изменению начальной активной формы фермента E с образованием менее активной формы E' [схема (2)]



в) фермент может быстро взаимодействовать с субстратом с выделением одного из продуктов и образованием промежуточного соединения, в которое входит фермент и субстратный остаток; затем происходит более медленный стационарный распад этого промежуточного соединения, как это показано на схеме (3) для гидролиза НФА, катализируемого химотрипсином



Случай б) — это возможное объяснение быстрого образования продукта в начальный период при гидролизе АТФ, катализируемом миозин-АТФ-азой [3]. При некоторых экспериментальных условиях величина «выброса» продукта соответствует выделению 1 моля фосфата на каждый моль миозина. Если ситуация б) правильно объясняет данное явление, то это значит, что связывание АТФ с эквимольным количеством фермента вызывает конформационное изменение (возникающее, возможно, параллельно с реакцией гидролиза), которое приводит к образованию менее активной формы фермента E' . Возможность появления таких изменений, индуцируемых в белковой молекуле химической реакцией, имеет особое значение для фермента, который участвует в превращении химической энергии в механическую в процессе сжатия мускулов.

Начальный выброс n -нитрофенола в реакции химотрипсина с НФА также соответствует 1 молю продукта на каждый моль фермента. В данном случае это стехиометрическое соотношение находит более простое объяснение [4], которое заключается в том, что в реакции химотрипсина с НФА образуется ацилфермент и при этом происходит выделение одного эквивалента n -нитрофенола. Это объяснение согласуется с тем, что ацилфермент можно выделить из разбавленного кислого раствора, где он относительно стабилен. Ацилфермент может реагировать с гидроксиламином и другими акцепторами ацильной группы с образованием 1 моля ацилированного акцептора. Такой промежуточный продукт, как триметилацетилхимотрипсин, был даже выделен в кристаллическом виде [4]. Этот успех приобретает особое значение в связи с тем, что всего несколько лет назад обсуждалось, существуют ли вообще фермент-субстратные промежуточные соединения.

Несмотря на то что НФА является химически высокореакционным соединением, это плохой субстрат химотрипсина. Поэтому для изучения его гидролиза необходимо использовать большие концентрации фермента. Именно благодаря этим высоким концентрациям фермента, а также тому, что превращение НФА под действием фермента является достаточно медленным после достижения стационарного состояния реакции, и удалось обнаружить первоначальный выброс n -нитрофенола. Позднее выброс продукта

в начальный момент был показан также для реакции химотрипсина со специфическим субстратом, а именно *n*-нитрофениловым эфиром *N*-ацетил-*L*-триптофана в интервале значений рН 2—4. В этих условиях скорость гидролиза даже столь специфического субстрата является достаточно медленной, что позволяет использовать высокую концентрацию фермента при достаточно низкой стационарной скорости превращения субстрата [5].

За образованием и распадом фермент-субстратных промежуточных соединений можно непосредственно наблюдать в случае медленно реагирующих субстратов, или в неблагоприятных условиях для протекания реакции,

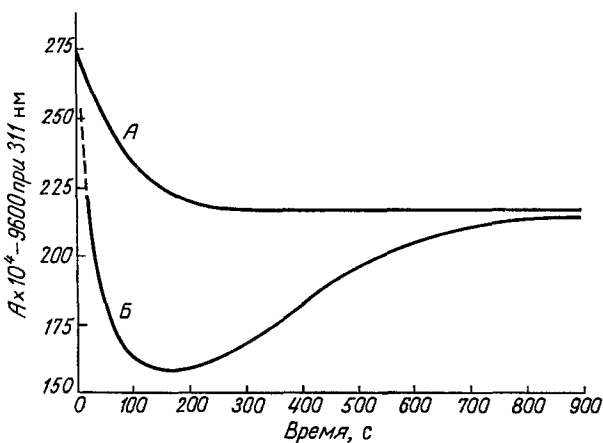
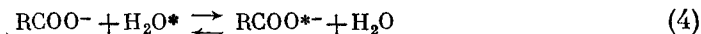


Рис. 2. Изменение оптической плотности раствора, соответствующее протеканию реакции *N*-ацетил-*L*-триптофана (А) и метилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана (В) с химотрипсином при рН 2,42 [5].

или при наличии специальной аппаратуры для изучения быстрых реакций. Так, при взаимодействии небольших количеств метилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана с химотрипсином при рН 2,42 происходит сначала небольшое уменьшение, а затем увеличение оптической плотности раствора при 311 нм (рис. 2) [5]. Значение константы скорости, характеризующей увеличение поглощения, совпадает с величиной, которая следует из максимальной скорости гидролиза *n*-нитрофенилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана в тех же условиях. Последняя величина характеризует скорость деацилирования ацилфермента [схема (3), k_3], поскольку стадия ацилирования в случае *n*-нитрофениловых эфиров протекает значительно быстрее стадии деацилирования. Такое совпадение значений констант скоростей, полученных в двух независимых опытах, позволяет предположить, что правая ветвь кривой В на рис. 2 отражает деацилирование того же ацилфермента, но образовавшегося в реакции химотрипсина с метиловым эфиром. Кривая А отражает аналогичный эксперимент со свободной кислотой (*N*-ацетил-*L*-триптофан). Наблюдаемое спектральное изменение можно связать с появлением конформационных изменений в ферменте, индуцируемых субстратом, однако более вероятным является другое объяснение: кривая А описывает ацилирование фермента *N*-ацетил-*L*-триптофаном с образованием равновесной смеси свободного и ацилированного фермента. С этим согласуется тот факт, что величина начального выброса продукта при добавлении к ферменту *n*-нитрофенилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана и, следовательно, количество свободного фермента, который может быть проацилирован, уменьшаются после предварительного инкубирования фермента с данной кислотой. Наблюдая за изменением количества свободного фермента при различных концентрациях кислоты, можно вычислить константу равновесия образования

ацилфермента из свободной кислоты и химотрипсина. Скорость образования ацилфермента из свободной кислоты при более высоких значениях pH можно приблизительно оценить по скорости обмена ^{18}O между водой и N-ацетил-L-триптофаном [уравнение (4), pH 7,9], если принять, что фермент



ацилируется лишь неионизованной формой кислоты. Кроме того, необходимо учесть поправки на зависимость ферментативной активности от значения pH и на количество свободной кислоты, существующей при pH 7,9. Проведенное рассмотрение показывает, что даже такой плохо реагирующий субстрат, каким является карбоксилат-ион, может реагировать с ферментом в виде более реакционной свободной кислоты, образуя ацилфермент. Гораздо большие спектральные изменения при ацилировании и деацилировании обнаруживают менее специфические субстраты типа производных циннамоила, фуриоила или бензоила, которые также реагируют с химотрипсином, образуя ацилфермент. Эти соединения оказались удобными для кинетических исследований стадии ацилирования и деацилирования в условиях, когда обе реакции протекают достаточно медленно, и для их изучения можно использовать обычную спектрофотометрическую аппаратуру [6, 7].

Краситель профлавин связывается с активным центром химотрипсина, при этом спектральные свойства его изменяются. Наблюдаемое смещение спектра можно положить в основу метода измерения констант скоростей и равновесий при образовании и распаде фермент-субстратных промежуточных продуктов, поскольку взаимодействие субстрата с активным центром предотвращает связывание красителя [8].

Основное экспериментальное ограничение всех этих методов заключается в том, что за образованием и распадом промежуточных соединений можно наблюдать непосредственно лишь при наличии значительных количеств чистого фермента. Ниже описаны косвенные методы, которые позволяют использовать для этой же цели каталитические количества фермента, и нет необходимости даже применять чистый фермент, если только примеси не влияют на его активность.

2. РАСПАД С ОДИНАКОВОЙ СКОРОСТЬЮ ОБЩЕГО ПРОМЕЖУТОЧНОГО СОЕДИНЕНИЯ, ОБРАЗОВАВШЕГОСЯ ИЗ РАЗНЫХ СУБСТРАТОВ

Если имеется ряд сложных эфиров с одинаковой ацильной группой, но с разными уходящими группами и эти эфиры быстро реагируют с ферментом, образуя промежуточный ацилфермент, который затем медленно гидролизует, то максимальная скорость ферментативного гидролиза всех этих сложных эфиров должна быть одинаковой, поскольку скорость определяющей стадией будет гидролиз общего для всех случаев ацилфермента [уравнение (5), k_3]. В табл. 2 приведены в качестве примера данные по гидролизу папаином ряда сложных эфиров карбобензоксиглицина. Близкие

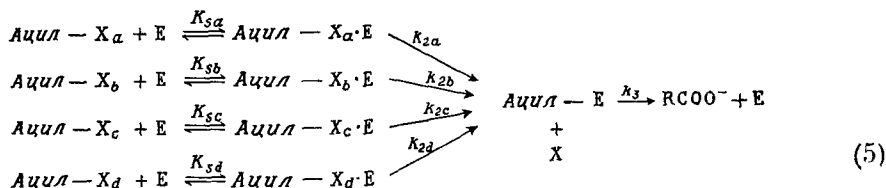


Таблица 2

Скорости реакций сложных эфиров карбобензоксиглицина при 25° [9]

Сложный эфир	Реакция, катализируемая папаином (рН 6,8)		Неферментативный гидролиз k_{OH^-} , л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹
	K_M , моль/л·10 ⁻⁵	V_{max} , с ⁻¹	
<i>n</i> -Нитрофениловый	0,93	2,73	115
<i>m</i> -Нитрофениловый	1,89	2,18	67,5
<i>o</i> -Нитрофениловый	15,2	2,14	61,5
Фениловый	10,7	2,45	12,1
Этиловый	514	1,90	0,676

значения максимальных скоростей гидролиза различных сложных эфиров позволяют предположить, что во всех реакциях существует общий промежуточный ацилфермент (карбобензоксиглицилпапаин), гидролиз которого с константой скорости k_3 лимитирует скорость реакции с ферментом всех указанных сложных эфиров [9].

В большинстве экспериментов подобного рода максимальные скорости гидролиза различных сложных эфиров все-таки несколько различаются. Для объяснения этих различий можно указать на следующие причины:

а) *Ошибки измерений.* Ошибку в измерениях скорости указывают не всегда, однако в тех случаях, когда ошибка приведена, она, как правило, меньше наблюдаемых различий в скорости. Это может свидетельствовать либо о чрезмерной самоуверенности некоторых исследователей, либо о том, что разница в скорости действительно является реальной и требует объяснения.

б) *Общее промежуточное соединение отсутствует, но скорости случайно совпадают.* Если субстраты химически близки, то не удивительно, что фермент катализирует их гидролиз, протекающий по механизму с прямым участием воды, с близкими, но не совсем идентичными скоростями. Это объяснение маловероятно в случае, где сложные эфиры сильно различаются своей реакционной способностью, как это видно из табл. 2, в которой приведены константы скорости их щелочного гидролиза (k_{OH^-}).

в) *Скорость определяющей стадией является конформационное изменение фермента.* Если для протекания ферментативной реакции необходимо конформационное изменение фермента, индуцируемое субстратом, то маловероятно, чтобы эта стадия в случае различных субстратов протекала с одинаковой скоростью, тем не менее скорости могут быть близкими (гл. 5, разд. Д.).

г) *Различия в эффективности ингибирования продуктом для различных реакций.* Этого осложнения можно избежать, измеряя истинные начальные скорости. Кроме того, это объяснение можно проверить непосредственно путем добавления продукта.

д) *Ингибирование субстратом.* Несмотря на то что ингибирование субстратом при связывании его с ацилферментом легко наблюдать кинетически, при малых глубинах ингибирования данный механизм можно и не обнаружить. Последнее может привести к различиям в кажущейся константе скорости реакции для разных субстратов.

е) *Скорость реакции определяет стадия, контролируемая диффузией.* Столкновение реагентов с компонентами растворителя или перемещение группы фермента в каталитически активное положение может протекать с исключительно большими скоростями. Однако если этим процессам предшествует хотя бы одна или несколько неблагоприятных равновесных стадий, то они могут лимитировать скорость протекания даже относительно медленной реакции. В этом случае при наличии общей для разных субстратов ско-

рость определяющей стадии такого типа будет наблюдаться одинаковая скорость реакции.

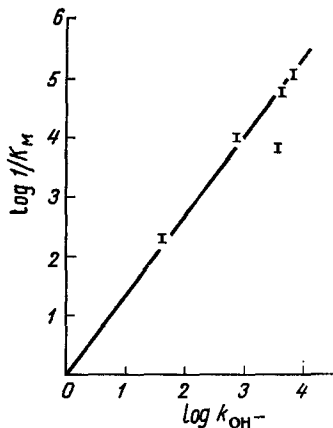
ж) *Распад ковалентного фермент-субстратного промежуточного соединения не полностью определяет скорость реакции.* Скорость ацилирования в ряду доноров, где свойства уходящей группы постепенно ухудшаются, должна соответственно замедляться. Когда скорость ацилирования станет равной скорости стадии деацилирования, то наблюдаемая максимальная скорость реакции уменьшится, поскольку ацилирование частично начнет лимитировать общую скорость процесса. При наличии очень «плохой» уходящей группы в молекуле ацилирующего агента стадия ацилирования может полностью определять скорость реакции. Именно так стоит вопрос при гидролизе химотрипсина амидных субстратов. Амиды под действием химотрипсина гидролизуются на несколько порядков медленнее сложных эфиров, содержащих ту же ацильную группу. Более медленная реакция этилового эфира (табл. 2) может означать, что при гидролизе этого субстрата папаином ацилирование частично лимитирует скорость процесса.

Хорошо известно, что константа диссоциации первоначального фермент-субстратного комплекса K_s не обязательно совпадает с константой Михаэлиса K_M . В ряде случаев это обусловлено образованием фермент-субстратного промежуточного соединения [см., например, уравнение (3) или (5)]. Для реакции, в которой начальная стадия связывания быстрая, соотношение между этими константами дается уравнением (6) [10]. В том случае, когда скорость реакции лимитируется ацилированием и деацилирование идет быстро, т. е. $k_3 \gg k_2$, уравнение (6) можно упростить:

$$K_M = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3}, \quad (6)$$

и наблюдаемая на опыте константа Михаэлиса оказывается действительно равной константе диссоциации фермент-субстратного комплекса, т. е. $K_M = K_s$. В противном случае, когда скорость реакции лимитируется деацилированием, т. е. $k_3 \ll k_2$, выражение для константы Михаэлиса можно привести к виду $K_M = K_s k_3 / k_2$ и, как видно, оно включает константы скоростей всех стадий процесса. Если значения истинной константы диссоциации K_s для ряда субстратов мало различаются и константа скорости k_3 постоянна, то переменной величиной в измеряемом значении K_M будет лишь константа

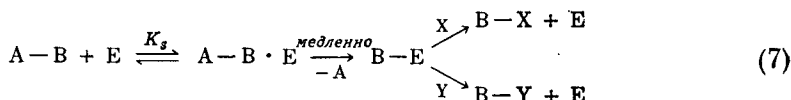
Р и с. 3. Зависимость величины $1/K_M$ в реакции, катализируемой папаином, от константы скорости щелочного гидролиза ряда сложных эфиров карбобензоксиглицина при 25 °C [9].



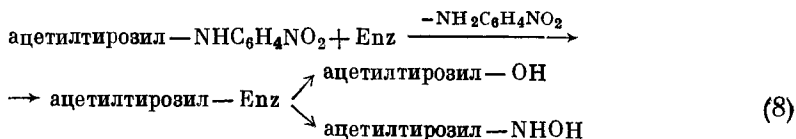
скорости стадии ацилирования k_2 . Следовательно, в этом случае изменение константы Михаэлиса для разных субстратов будет обусловлено лишь изменением одной этой константы скорости. Значения констант Михаэлиса для катализируемой папаином реакции гидролиза ряда сложных эфиров карбобензоксиглицина уменьшаются в обратной зависимости от скорости неферментативной реакции этих сложных эфиров с ионом гидроксидов (табл. 2, рис. 3). Точка, которая на рисунке остается ниже прямой, соответствует пространственно затрудненному *о*-нитрофениловому эфиру. Таким образом, тот факт, что константа Михаэлиса уменьшается по мере того, как улучшаются свойства уходящей группы, указывает лишь на увеличение реакционной способности субстрата, которое проявляется как в увеличении константы скорости ацилирования (k_2), так и константы скорости щелочного гидролиза ($k_{\text{ОН-}}$).

3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНОГО ПРОДУКТА МЕЖДУ ДВУМЯ РЕАКЦИЯМИ РАСПАДА С ПОСТОЯННОЙ ОБЩЕЙ СКОРОСТЬЮ

Рассмотрим реакцию, в которой скорость определяющей стадией является образование промежуточного продукта, реагирующего далее с двумя акцепторами и дающего разные продукты [уравнение (7)]. Если варьировать концентрации акцепторов, то распределение промежуточного продукта между этими реакциями будет меняться, однако сумма скоростей образования обоих продуктов останется неизменной и будет соответствовать скорости образования промежуточного продукта [схема (7)].

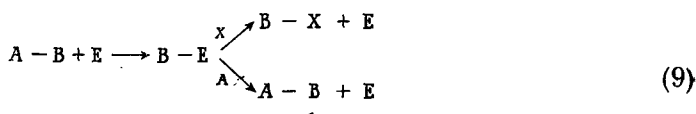


Не так давно был поставлен вопрос, протекает ли катализируемый химотрипсином гидролиз амидов через промежуточный ацилфермент или же молекула амида, сорбированная на активном центре фермента, подвергается прямой атаке водой или другим акцептором. При попытке решить данный вопрос с использованием рассмотренного кинетического метода были изучены ферментативные реакции гидролиза и гидроксиламинолиза *n*-нитроанилида *N*-ацетилтирозина при различных концентрациях гидроксилamina [схема (8)] [11].

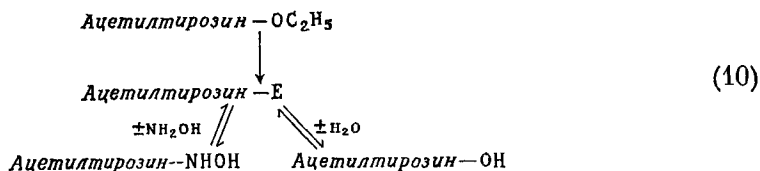


Если полагать, что катализируемый химотрипсином гидролиз амидов и анилидов протекает через промежуточный ацилфермент, то образование промежуточного продукта, несомненно, лимитирует скорость реакции, поскольку ферментативный гидролиз сложных эфиров с той же ацильной группой идет значительно быстрее. Тот факт, что суммарная скорость реакции, измеряемая по выделению *n*-нитроанилина, почти не меняется в присутствии гидроксилamina (даже в том случае, когда в присутствии 1,6 М гидроксилamina половину продукта составляет гидроксаметовая кислота), действительно согласуется с представлением, что реакция протекает через общий промежуточный продукт — ацилфермент. К сожалению, в этих опытах не были поровнь определены константы Михаэлиса и максимальные скорости реакции. В связи с этим очень вероятно, что высокая концентрация гидроксилamina, необходимая для образования заметных количеств гидроксаметовой кислоты, неспецифически изменяет один или оба эти кинетических параметра и тем самым мешает обнаружить увеличение суммарной скорости реакции. Интерпретация результатов осложнена также тем, что фермент катализирует гидролиз образующейся гидроксаметовой кислоты *N*-ацетилтирозина.

Частный случай рассматриваемой кинетической схемы — это реакция, где одним из акцепторов является сама уходящая группа *A* (точнее говоря, продукт, образующийся из нее). Реакция с этим акцептором приводит к образованию исходного субстрата и тем самым ингибирует образование продукта *B* — *X* [схема (9)].



При попытке применить этот кинетический метод к исследованию гидролиза под действием химотрипсина гидроксамовой кислоты N-ацетилтирозина сравнивали степень ингибирования этой реакции, наблюдаемую в присутствии гидроксилamina, со степенью ингибирования, предсказанной на основании распределения предполагаемого промежуточного ацилфермента между реакциями гидролиза и гидроксилamинолиза [12]. Для того чтобы определить долю каждой из этих реакций, измеряли в независимом эксперименте количества гидроксамовой и свободной кислот, образующихся под действием химотрипсина из этилового эфира ацетилтирозина в присутствии различных концентраций гидроксилamina [схема (10)].



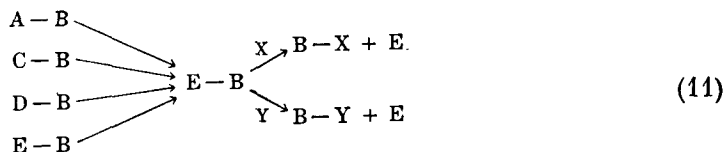
Результаты этих опытов не вполне согласуются с ацилферментным механизмом, однако затруднения в трактовке, возникающие вследствие зависимости отношения скоростей обеих реакций от концентрации фермента, не позволяют строго интерпретировать полученные данные. Более удивительным является тот факт, что скорость реакции синтеза гидроксамовой кислоты N-ацетилтирозина из свободной кислоты [см. нижнюю часть схемы (10)] не обнаруживает той зависимости от концентрации гидроксилamina, которую следовало бы ожидать, если исходить из относительных скоростей гидролиза и гидроксилamинолиза предполагаемого промежуточного ацилфермента. При высоких концентрациях гидроксилamina, когда промежуточный продукт распадается главным образом с образованием гидроксамовой кислоты, эффективная константа скорости этой стадии должна быть более высокой, чем в случае реакции присоединения (или отщепления) воды. Следовательно, синтез гидроксамовой кислоты из свободной кислоты должен лимитироваться скоростью образования ацилфермента, и поэтому скорость синтеза почти не должна зависеть от концентрации гидроксилamina. Однако на опыте это не так. Для объяснения результатов следует предположить влияние некоторого неконтролируемого фактора (например, эффекта растворителя), который искажает скорость реакции так, что с увеличением концентрации гидроксилamina она перестает стремиться к пределу, или допустить, что реакция не протекает по обычному механизму с участием ацилфермента.

Данную ситуацию можно исследовать полнее, если использовать меченый ингибитор А. При этом можно непосредственно определять скорость обратной реакции продукта А с промежуточным соединением и ее можно сравнить со степенью ингибирования реакции образования продукта В — Х. Примеры этого типа будут рассмотрены ниже в разделе, посвященном реакциям обмена.

4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ПРОМЕЖУТОЧНОГО СОЕДИНЕНИЯ МЕЖДУ ДВУМЯ РЕАКЦИЯМИ РАСПАДА С ПОСТОЯННЫМ ОТНОШЕНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИЙ ОБОИХ ПРОДУКТОВ

Независимо от того, которая из стадий лимитирует скорость реакции, распад общего промежуточного соединения, образующегося из нескольких разных доноров, должен характеризоваться постоянным отношением концентраций продуктов при данных концентрациях акцепторов Х и У [урав-

нение (11)]



Этот критерий, позволяющий судить об образовании промежуточного продукта, исходит из предположения, что фермент не может катализировать реакцию прямого переноса некоторой группы В из молекул разных доноров к акцепторам Х и Y при отношении скоростей, одинаковом для всех донорных молекул. Поэтому данный критерий является менее строгим, чем два предыдущих, сущность которых сводится к тому, что при наличии общего промежуточного продукта молекулы с самой различной реакционной способностью превращаются либо с одинаковыми скоростями, либо при постоянной сумме двух скоростей. Иными словами, случайное совпадение величин *отношения* скоростей является более вероятным, чем случайное совпадение абсолютных скоростей реакций для разных реагентов.

Этот критерий был использован для изучения катализируемых химотрипсином реакций сложных эфиров гиппуровой кислоты с гидроксиламином и водой [13]. При постоянной концентрации гидроксиламина различные сложные эфиры, которые существенно различаются по скоростям реакций, реагируют с ферментом с постоянным отношением концентраций продуктов гидроксиламинолиза и гидролиза, т. е. с постоянным отношением концентраций гидроксатовой кислоты и свободной кислоты (табл. 3). Наблюдаемое

Таблица 3

Отношение скоростей гидролиза и гидроксиламинолиза различных эфиров гиппуровой кислоты, катализируемых α -химотрипсином в присутствии 0,1 М гидроксиламина [13]

Эфир гиппуровой кислоты	Отношение скоростей гидроксиламинолиза и гидролиза	
	ферментативная реакция pH 6,7	неферментативная реакция pH 12
Метилловый	0,37	0,99
Изопропиловый	0,38	0,29
Гомохилиновый	0,37	1,73
4-Пиридинилметилловый	0,37	3,03

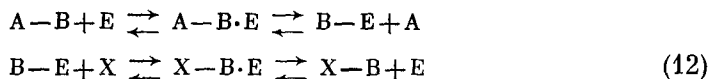
постоянное отношение скоростей обеих реакций указывает, по-видимому, на то, что гидроксиламин и вода реагируют с общим промежуточным продуктом гиппурилферментом. Этот вывод подтверждается тем фактом, что отношение скоростей гидролиза и гидроксиламинолиза в неферментативной реакции при pH 12 различается для разных сложных эфиров (табл. 3). Тем не менее трудно исключить однозначно возможность того, что фермент может катализировать прямую атаку гидроксиламином и водой различных эфиров с одинаковыми относительными скоростями.

5. КИНЕТИКА

Несмотря на многочисленные теоретические и экспериментальные работы, исследование стационарной кинетики редко оказывало решающее влияние на объяснение механизма ферментативного действия *. Единствен-

* Автор, несомненно, выражает свою личную точку зрения, с которой, как можно думать, согласятся далеко не все энзимологи. — *Прим. ред.*

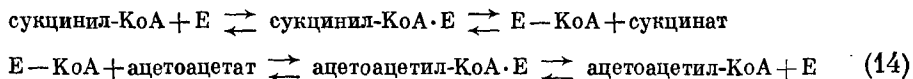
ный пример кинетического поведения субстрата в стационарных условиях, которое можно непосредственно интерпретировать в рамках определенного механизма, это кинетические закономерности, выражаемые в виде параллельных прямых в координатной системе обратных величин скорости реакции и концентрации субстрата ($1/v - 1/[S]_0$). Закономерности этого типа позволяют предположить, что суммарная реакция включает две стадии с образованием какого-либо промежуточного комплекса или соединения фермента с субстратной группой, участвующей в реакции переноса [«пинг-понг»-механизм, схема (12)] [14].



$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{макс}}} \left(\frac{K_{MAB}}{[AB]} + \frac{K_{MX}}{X} + 1 \right) \quad (13)$$

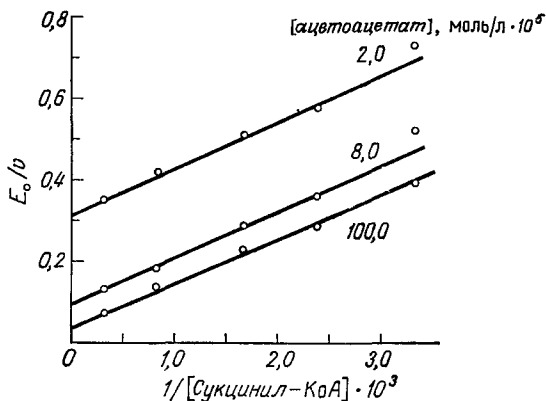
Кинетика такой реакции описывается уравнением (13). Это уравнение не содержит члена с произведением концентраций типа $K/[AB][X]$, который обычно входит в выражение для скорости реакции при наличии тройного комплекса или в случае других механизмов. Именно этот член и обуславливает пересечение прямых в координатной системе двойных обратных величин. Однако данный механизм кинетически нельзя доказать однозначно, поскольку отдельные кинетические константы реакции, например те, которые входят в член с произведением концентраций, могут быть слишком небольшими, чтобы этот член можно было обнаружить экспериментально. Следовательно, аналогичное кинетическое поведение может имитировать также и механизм с участием тройного комплекса, в котором первая стадия является медленной и по существу необратимой [14, 15]. Тем не менее наблюдение «пинг-понг»-кинетики приносит, по-видимому, наибольшую информацию из всех кинетических результатов, полученных при изучении ферментативных реакций в стационарных условиях. Дело в том, что на основании наблюдаемых кинетических закономерностей можно предположить определенный химический механизм, который затем можно проверить экспериментально.

Наиболее широко известными ферментами, которые действуют по «пинг-понг»-механизму переноса субстратной группы, являются трансаминазы, где промежуточное соединение фермента с группой В содержит аминок-группу, которая участвует в реакции переноса в виде связанного пиридоксаминфосфатного кофермента [16]. Такие же кинетические закономерности характерны для реакций с участием ряда флавиновых ферментов, где водород переносится как часть связанного восстановленного кофермента [17], или реакции с участием нуклеозиддифосфокиназы и фосфоглюкомутазы, которые катализируют перенос фосфатной группы, идущий через промежуточный фосфорил-фермент [18], или также реакции с участием фосфорилазы сахарозы, которая катализирует перенос глюкозы, образуя промежуточный глюкозилфермент [19]. В качестве примера на рис. 4 приведены кинетические закономерности в виде параллельных прямых для сукцинил-КоА-ацетоацетил-КоА-трансферазы, которая катализирует перенос КоА от одной ацильной группы к другой через промежуточное образование КоА — фермента согласно механизму (14) [20].



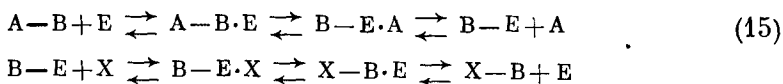
Интерпретация таких механизмов реакций исходит из представления, что они состоят из двух полуреакций. В данном случае легко понять, хотя бы качественно, почему прямые в координатной системе двойных обратных величин не пересекаются в точке на оси ординат, соответствующей некоторой

общей максимальной скорости реакции. Рассмотрим в качестве примера реакцию, которая описывается схемой (14). Если изучать эту реакцию при малой концентрации сукцинил-КоА, то первая полуреакция будет протекать с присущей ей малой скоростью, и, независимо от того, сколько будет добавлено ацетоацетата, истинная максимальная скорость суммарной реакции не будет достигнута из-за ограниченной скорости первой полуреакции. Подобным же образом, если зафиксировать концентрацию ацетоацетата, невозможно достигнуть истинной максимальной скорости реакции увеличением концентрации одного сукцинил-КоА, поскольку в этом случае общая скорость будет лимитироваться малой скоростью второй полуреакции.



Р и с. 4. «Пинг-понг»-кинетика в реакции ацетоацетата с сукцинил-КоА, катализируемой КоА-трансферазой [20].

Механизмы (12) и (14) являются, несомненно, упрощенными для реакций подобного рода, поскольку они не учитывают возможного связывания ферментом уходящей молекулы А и акцептора Х; тот факт, что фермент обнаруживает некоторую специфичность по отношению к этим молекулам, указывает, что такие центры связывания должны, безусловно, существовать. Уточненный механизм, включающий взаимодействие с центрами связывания, представлен в виде схемы (15).

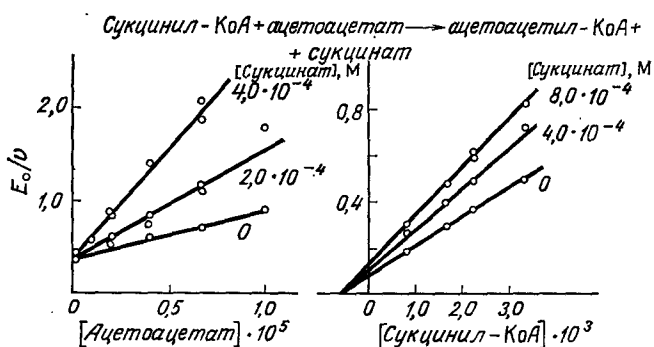


Кинетические закономерности, которые следуют из уравнения (15), являются такими же, как и в случае более простых уравнений (12) и (14), хотя детальная интерпретация кажущихся кинетических констант является несколько другой. Однако существование центров связывания приводит к тому, что молекула акцептора Х может связываться свободным ферментом и влиять таким образом на связывание им молекулы А — В, что приводит к своеобразному ингибированию субстратом. Для данного класса реакций такое поведение является обычным и приводит к отклонениям от параллельности прямых в координатах обратных величин при высоких концентрациях субстрата.

В отсутствие осложняющих факторов ингибирование молекулой донора А является конкурентным по отношению к молекуле акцептора Х и неконкурентным по отношению к исходному субстрату А — В. Такую картину наблюдали, например, при ингибировании КоА-трансферазы сукцинатом, конкурентным по отношению к ацетоацетату и неконкурентным по отношению к сукцинил-КоА (рис. 5). В простейшем случае ингибирование можно рассматривать как проявление обратимости первой полуреакции. В при-

сутствии сукцината промежуточный КоА — фермент, который образовался из сукцинил-КоА, будет частично реагировать с сукцинатом, регенерируя исходный субстрат. Эта обратная реакция конкурирует с реакцией, в которой под действием ацетоацетата образуется продукт. Фактически ацетоацетат и сукцинат конкурируют между собой за реакцию с промежуточным продуктом ферментативного процесса. Ингибирование можно частично предотвратить добавлением большего количества сукцинил-КоА для увеличения скорости первой полуреакции, однако некоторая доля промежуточного соединения всегда будет реагировать с сукцинатом, образуя исходный субстрат вместо продуктов. При наличии заметного связывания молекул А или Х ферментом механизм реакции следует интерпретировать несколько иначе (кинетические закономерности такого осложняющего влияния были рассмотрены выше для реакции в отсутствие ингибитора).

Детальное рассмотрение «пинг-понг»-механизма приводит ко всем четырем известным соотношениям Холдена, которые иллюстрируют связь между

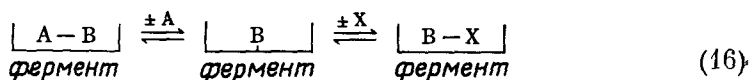


Р и с. 5. Ингибирование сукцинатом реакции, катализируемой КоА-трансферазой. Конкурентное по отношению к ацетоацетату и неконкурентное по отношению к сукцинил-КоА [20].

суммарными константами равновесия ферментативной реакции и наблюдаемыми кинетическими константами [21]. Соответствие кинетических констант этим четырем соотношениям может служить дополнительным подтверждением справедливости данного механизма.

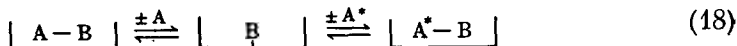
6. РЕАКЦИИ ОБМЕНА И ПЕРЕНОСА

Часто полагают, что наличие изотопного обмена, катализируемого ферментом, или протекание реакций переноса химических групп может само по себе служить доказательством существования ковалентного фермент-субстратного промежуточного соединения. Однако в отсутствие дополнительной информации такой вывод неправилен. Нет никаких оснований считать, что перенос группы В из А — В к Х, катализируемый ферментом и протекающий через промежуточное соединение фермент — В [схема (16)]

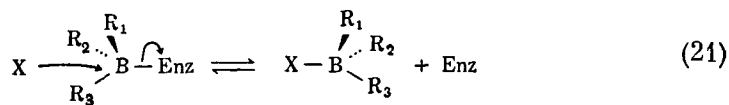
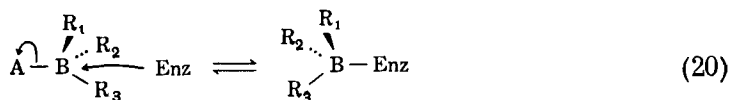


более вероятен, чем прямое замещение А на Х [схема (17)]. Подобным же образом обмен изотопно меченой группы А*, входящей в АВ, также может протекать либо через промежуточное соединение фермент — В [схема (18)],

либо по реакции прямого замещения [схема (19)]



Существование промежуточного соединения фермент — В в таких реакциях можно предполагать, однако, на основании других критериев. Рассмотрим реакцию, в которой прямой перенос насыщенного атома углерода (входящего в группу В) от А к Х должен бы идти с обращением конфигурации, однако на опыте протекание реакции конфигурацию не изменяет. В этом случае следует полагать, что реакция идет по механизму двойного замещения, согласно которому фермент замещает А с обращением, образуя соединение фермент — В, а последующее вытеснение фермента заместителем Х приводит ко второму обращению и, следовательно, к образованию продукта В — Х, в котором сохранена исходная конфигурация [схемы (20) и (21)].

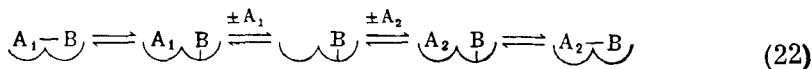


Реакция переноса глюкозы между фруктозой и фосфатом, катализируемая фосфорилазой сахарозы, протекает с сохранением конфигурации. На этом основании можно полагать, что реакция идет с образованием промежуточного глюкозилфермента. Ряд родственных ферментов также катализируют реакции переноса с участием сахаров при сохранении конфигурации [22]. Образование глюкозилфермента получило недавно подтверждение. Этот промежуточный продукт удалось выделить в реакции фосфорилазы сахарозы с меченой сахарозой [23]. Следует отметить, что в данном контексте термин «замещение» вовсе не характеризует химический механизм, но отражает лишь стереохимию реакции; эти реакции с таким же успехом могут протекать с той же стереоспецифичностью через экранированные ионы карбония, а не по механизму S_N2 -замещения.

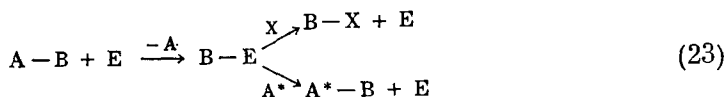
Чтобы реакция обмена A^* с $A-B$ могла протекать по механизму прямого замещения [так, как это показано на схеме (19)], необходимо, чтобы соединение A^* было комплементарным по отношению к центру, с которым обычно связывается акцептор Х. Реакция обмена может идти по механизму (19) в том случае, когда фермент является неспецифическим по отношению к акцептору или когда фермент вовсе не имеет акцепторного центра. Очевидно, в данной ситуации нельзя рассматривать наличие реакции обмена как свидетельство того, что ферментативная реакция протекает с образованием промежуточного соединения фермент — В. Однако в том случае, когда фермент является высокоспецифичным по отношению к акцептору Х и когда продукт А структурно отличается от Х, трудно ожидать, чтобы A^* могло быть комплементарным по отношению к акцепторному центру, и, следовательно, наличие реакции обмена указывает, что реакция протекает по механизму (18) с промежуточным образованием соединения фермент — В.

Аналогичные рассуждения справедливы и по отношению к реакциям переноса.

Изложенную точку зрения можно проиллюстрировать на примере реакций лизоцима, который катализирует реакцию переноса атома углерода C_1 гликозидных субстратов к воде, спиртам и сахарам [24]. Тот факт, что продукты реакций переноса (к спиртам) имеют ту же β -конфигурацию, что и исходные соединения, означает, что реакция осуществляется не как единичное S_N2 -замещение, приводящее к обращению конфигурации. Это должен быть либо механизм двойного замещения, либо механизм с участием экранированного иона карбония, либо относительно неправдоподобный механизм фронтального замещения. Тот факт, что специфические акцепторы — сахара, такие, как N -ацетилглюкозамин, действуют приблизительно на три порядка более эффективно, чем вода или простые спирты, означает, что молекула акцептора связывается со специфическим центром. Уходящая группа A_1 , структурно подобная акцептору A_2 , должна сперва покинуть этот центр, чтобы могло произойти связывание акцептора. В то же время группа, которая подлежит переносу (B), остается в некотором активированном состоянии на ферменте; это значит, что реакция протекает с образованием промежуточного соединения [схема (22)].



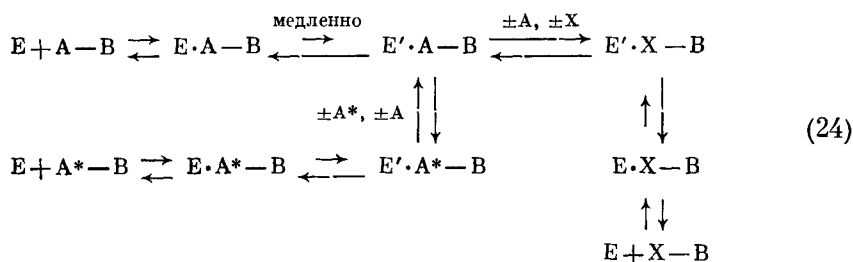
Другого типа доказательство существования промежуточного соединения фермент — B следует из количественного анализа реакции обмена. Если увеличить концентрацию акцептора на столько, чтобы образование $B-X$ происходило с максимальной скоростью, то данная скорость часто оказывается равной скорости образования промежуточного соединения фермент — B [уравнение (23)]. Если же максимальная скорость реакции



обмена A^* с образованием A^*-B совпадает с максимальной скоростью образования $B-X$, то это дает основание полагать, что в обоих случаях измеряют скорость образования промежуточного соединения фермент — B , общего для обеих реакций. Невозможно представить себе, что эти скорости могли бы быть одинаковыми в случае простого механизма прямого замещения, поскольку A^* и X не могут вытеснить A с идентичными скоростями. С другой стороны, если скорости образования $B-X$ и A^*-B не совпадают, то это не исключает существования промежуточного соединения фермент — B . Эти скорости могут отличаться из-за медленной десорбции $B-X$ или A^*-B с фермента. В этом случае максимальная скорость образования продукта $B-X$ может быть меньше максимальной скорости образования промежуточного соединения фермент — B , если только тот факт, что скорость при высоких значениях концентрации X стремится к пределу, обусловлен насыщением центра связывания акцептора, а не вызван тем, что образование промежуточного соединения фермент — B стало скоростью определяющей стадией.

Для объяснения равенства максимальных скоростей образования продукта $B-X$ и реакции обмена с образованием A^*-B можно представить альтернативный, но менее вероятный механизм реакции, протекающей без

участия промежуточного соединения фермент — В [схема (24)]. Допустим, что в результате индуцируемого



субстратом конформационного изменения фермента происходит медленное образование активированного промежуточного соединения $E' \cdot A - B$. Это соединение может реагировать с акцептором X (образуя $B - X$) или подвергаться обмену при участии A^* (давая $A^* - B$) с одинаковыми максимальными скоростями. Однако из кинетического анализа схемы реакций (24) следует, что кинетические закономерности этого механизма нельзя представить в координатной системе обратных величин (скорость реакции — концентрация субстрата) в виде параллельных прямых («пинг-понг»-кинетика). Кроме того, закономерности ингибирования, присущие механизму (24), также являются иными по сравнению с теми, которым подчиняется «пинг-понг»-механизм.

Примером системы, для которой наблюдали равенство максимальных скоростей реакций обмена и образования продукта, служит реакция, катализируемая КоА-трансферазой в присутствии ацетоацетил-КоА [20]. Результаты эксперимента приведены в табл. 4. Максимальная скорость реакции обмена, в которой взаимодействие промежуточного соединения фермент — КоА с ацетоацетатом приводит к образованию ацетоацетил-КоА, совпадает с максимальной скоростью реакции этого промежуточного соединения с сукцином при образовании в качестве продукта сукцинил-КоА.

Таблица 4

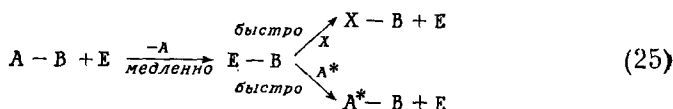
Реакция обмена ацетоацетата с ацетоацетил-КоА, катализируемая КоА-трансферазой [20]

Концентрация ацетоацетата, М	Скорость обмена ацетоацетата, нмоль/мин
$4 \cdot 10^{-4}$	134
$2 \cdot 10^{-3}$	193
$1 \cdot 10^{-2}$	276
При экстраполяции к бесконечно большой концентрации	280
Максимальная скорость образования сукцинил-КоА	260

7. РЕАКЦИИ ОБМЕНА И ИНГИБИРОВАНИЯ

При условии, что реакция протекает при «насыщающей» концентрации акцептора X , скорость образования продуктов отражает, как правило, скорость образования промежуточного соединения $E - B$ [схема (25)]. Если

теперь добавить в систему первый

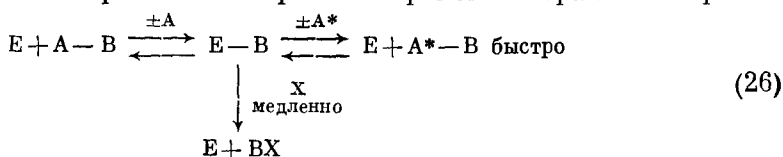


продукт А, это приведет к ингибированию реакции, поскольку промежуточное соединение будет реагировать с А, регенерируя исходное вещество, вместо того чтобы взаимодействовать с Х, образуя продукт реакции, как это было описано выше. Найденная при этом степень ингибирования должна совпадать с вкладом в суммарный процесс обратной реакции и при использовании меченого соединения А* соответствовать содержанию изотопа в исходном веществе. Этот подход весьма полезен и представляет собой чувствительный способ проверки механизма, поскольку маловероятно, чтобы степень обмена А* с А — В, наблюдаемая в случае простого механизма замещения, могла оказаться равной степени ингибирования реакции под действием А. Фактически в данном случае имеется та же ситуация, что и при распределении общего промежуточного соединения между двумя реакциями с постоянной общей скоростью распада [схемы (7) и (9)], с той лишь разницей, что одним из продуктов является меченое исходное вещество.

Как было показано в предыдущем разделе, различия в степенях ингибирования и обмена, наблюдаемые на опыте, еще не исключают возможности существования промежуточного соединения, поскольку его образование не обязательно является скоростью определяющей стадией.

При помощи этого подхода было доказано промежуточное образование фосфорилфермента в реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатазой [25]. В качестве ингибитора была использована глюкоза. В условиях, когда фермент, по всей вероятности, насыщен обычным для него акцептором, а именно водой, степень ингибирования ферментативной реакции глюкозой соответствует содержанию меченой глюкозы, вошедшей в глюкозо-6-фосфат.

Если концентрация акцептора Х настолько низкая, что продукт В — Х образуется со скоростью, меньшей чем максимально возможная скорость образования промежуточного соединения Е — В, последнее будет в системе накапливаться, т. е. его концентрация будет возрастать. В присутствии меченого продукта А* в результате его взаимодействия с промежуточным продуктом будет возникать исходное вещество. Это приведет к уменьшению скорости образования конечного продукта В — Х за счет уменьшения стационарной концентрации промежуточного соединения Е — В. В данных условиях, однако, эффект ингибирования будет относительно меньше, чем в предыдущем случае, а глубина обмена А* с А — В будет *больше*, чем это следует из степени ингибирования. Это обусловлено тем, что скорость образования промежуточного соединения в этих условиях больше, чем следовало бы из скорости образования продукта В — Х. В данном случае можно считать, что реакции первой стадии являются быстрыми и поэтому первая стадия близка к равновесию, в то время как образование продукта — это стадия, лимитирующая скорость процесса в целом [схема (26)]. Таким образом, первая стадия, в результате которой осуществляется реакция обмена, успевает пройти многократно в прямом и обратном направле-



ниях, прежде чем во второй стадии образуется небольшое количество продукта. Предельным случаем этой ситуации является, естественно, процесс, в котором в отсутствие акцептора X протекает лишь реакция обмена.

Обе кинетические картины, соответствующие высоким и низким концентрациям сукцината (т. е. акцептора промежуточного соединения фермент — КоА), имеют место в механизме действия сукцинил-КоА — ацетоацетат-КоА-трансферазы [20]. В условиях насыщения сукцинатом и в отсутствие ацетоацетата каждая молекула фермент — КоА, которая образовалась из ацетоацетил-КоА, может реагировать только с сукцинатом, давая сукцинил-КоА. В присутствии ацетоацетата в качестве ингибитора те молекулы промежуточного соединения фермент — КоА, которые прореагировали с ацетоацетатом, становятся недоступными для реакции с сукцинатом, и поэтому падение скорости в результате ингибирования равно скорости обмена ацетоацетата с ацетоацетил-КоА (табл. 5, первые две строки). При низких концентрациях сукцината скорость первой реакции, в результате которой образуется промежуточное соединение фермент — КоА, превышает скорость взаимодействия промежуточного соединения с сукцинатом. Поэтому эффективность обмена ацетоацетата с ацетоацетил-КоА становится больше, чем степень ингибирования реакции образования сукцинил-КоА (табл. 5).

Таблица 5

Соотношение скоростей реакций ингибирования и обмена, протекающих с участием ацетоацетата в процессе ацетоацетил-КоА + сукцинат → сукцинил-КоА + ацетоацетат, катализируемом КоА-трансферазой [20]

Ингибитор, ацетоацетат	Сукцинат, М	Образование сукцинил-КоА, нмоль/мин	Ингибирование, нмоль/мин	Скорость обмена ацетоацетат → ацетоацетил-КоА, нмоль/мин	Обмен/ингибирование
—	0,014	213			
+	0,014	107	106	114	1,1
—	0,004	68			
+	0,004	29	39	165	4,2
—	0,0008	27			
+	0,0008	23	4	30	7,4

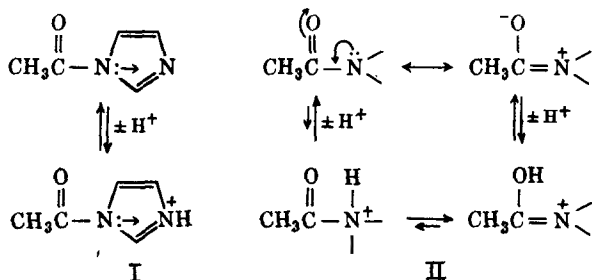
В. НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ

1. ИМИДАЗОЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ ПЕРЕНОСА АЦИЛЬНЫХ ГРУПП

Нуклеофильный катализ реакции переноса ацильной группы в неферментативных процессах удобно пояснить на примере катализируемых имидазолом реакций гидролиза и переноса ацетильной группы *n*-нитрофенилацетата и родственных ему активированных ацилпроизводных [26, 27]. Каталитическому превращению подвергаются лишь активированные ацилпроизводные, содержащие хорошую уходящую группу, которую имидазол способен вытеснить; иными словами, для катализа важно, чтобы ацилпроизводное по своей реакционной способности походило на ангидрид. Реакция протекает согласно механизму, приведенному в виде схемы (27), с промежуточным образованием ацетилимидазола, который можно обнаружить по характерной для него полосе поглощения при 245 нм. В отсутствие акцепторов ацильной группы, помимо воды, единственным процессом, который можно наблюдать,

катализаторами являются имидазол и N-метиylimидазол, что обусловлено их особыми свойствами. Это амины, обладающие с учетом их основности большей реакционной способностью, чем ион гидроксила. Более того, это третичные амины, которым присуща более высокая нуклеофильность, чем первичным или вторичным аминам. Повышенная реакционная способность третичных аминов снижается возросшими стерическими препятствиями. Однако роль заместителей при атоме азота в производных имидазола выполняет пятичленное ароматическое кольцо, которое почти не вызывает стерических затруднений. Значение pK_a имидазола равно приблизительно 7, и, следовательно, имидазол — это наиболее сильное основание, которое может существовать в свободном виде при нейтральных значениях pH. Более слабое основание должно обладать меньшей нуклеофильной способностью, в то время как более сильное основание (хотя оно реакционноспособнее в форме свободного основания) при нейтральном значении pH частично протонировано и поэтому при той же общей концентрации амина должно реагировать менее эффективно.

Промежуточный ацетилимидазол чрезвычайно восприимчив к атаке нуклеофильными реагентами. Это обусловлено тем, что он легко протонируется с образованием реакционного ацетилимидазольного иона, у которого энергия стабилизации за счет резонанса меньше, чем у обычных амидов. Значение pK_a ацетилимидазольного иона составляет 3,6, в то время как у обычных амидов эта величина близка к нулю. Одна из причин высокой основности ацетилимидазола заключается в том, что протонирование может происходить у другого атома азота, к которому не присоединена ацильная группа, без существенного нарушения резонансной стабилизации (I)

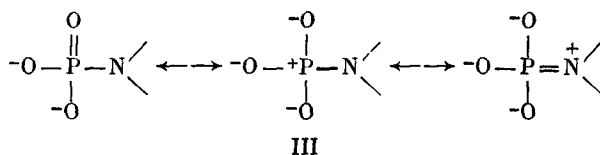


Протонирование обычных амидов затрагивает атом кислорода, так как протонирование атома азота сопровождается существенной потерей резонансной стабилизации (II). При протонировании кислорода, хотя оно и облегчает атаку нуклеофильным реагентом, окончательное вытеснение амина и завершение реакции могут произойти только после переноса протона с кислорода на азот. Протонирование азота непосредственно активизирует уходящий амин. Однако главной причиной высокой реакционной способности ацетилимидазола и ацетилимидазольного иона является прежде всего упомянутая выше относительно небольшая резонансная стабилизация этих соединений по сравнению с обычными амидами. Неподделенная пара электронов на атоме азота, которая в обычных амидах взаимодействует с карбонильной группой (II), в ацетилимидазоле в значительной мере недоступна для подобного резонанса, поскольку она принимает участие в π -электронной системе ароматического цикла (I).

И наконец, промежуточный ацетилимидазол, хотя он и быстро образуется из подходящих доноров ацила, по сравнению с другими амидами, сложными эфирами и эфирами тиоловой кислоты термодинамически неустойчив [28]. Свободная энергия гидролиза ацетилимидазола при pH 7 равна -13 ккал/моль ($54,5$ кДж/моль), а для ацетилимидазольного иона она еще более отрицательна.

Учитывая все это, можно ожидать, что имидазольные группы остатков гистидина проявляют свойства нуклеофильных катализаторов в активных центрах ферментов. Действительно, обнаружение каталитических реакций с участием имидазола, а также то, что проявление ферментативной активности химотрипсином и родственными ему ферментами обусловлено наличием свободной имидазольной группы, позволили предположить, что имидазол на самом деле выполняет именно эту роль в ферментативном катализе. Однако оказалось, что нуклеофильный катализ химотрипсином и родственными ему ферментами протекает с промежуточным образованием сложного эфира из ацильной группы субстрата и гидроксильной группы остатка серина. К настоящему времени нет никаких убедительных данных, подтверждающих, что имидазол выступает в качестве нуклеофильного катализатора в какой-либо ферментативной реакции переноса ацильной группы. На первый взгляд это может показаться удивительным, однако вопрос становится понятным, если вспомнить, что имидазол — это эффективный нуклеофильный катализатор лишь в случае реакций с участием высокоактивированных ацильных групп, позволяющих образоваться промежуточному ацилимидазолу. В большинстве биологических реакций переноса ацильной группы принимают участие менее активированные ацилпроизводные. В неферментативных реакциях с участием таких соединений (в том числе в реакциях с участием О-ацетилсерина, который представляет собой модель ацилфермента) имидазол выступает как общесосновной, а не нуклеофильный катализатор. По-видимому, имидазол является общесосновным катализатором также и в ферментативных реакциях [29, 30].

Имеются некоторые сведения, что имидазол действует в качестве нуклеофильного катализатора в ферментах, которые катализируют перенос фосфатной группы. После инкубации донора фосфорильной группы с сукцинилтиокиназой или с ферментом, который катализирует перенос фосфатной группы от фосфоенолпирувата к гексозе, из раствора удалось выделить фосфорилимидазольные производные [31]. Однако в неферментативных процессах имидазол не является уже очень хорошим нуклеофилом по отношению к монозамещенным фосфатам. Кроме того, фосфорилимидазолы по сравнению с другими фосфорзамещенными амидами не представляют собой слишком реакционноспособные соединения. Причина заключается, по-видимому, в том, что резонансная стабилизация с участием атома азота является намного менее существенной в фосфатах (III), чем в ацилпроизводных [32, 33].



2. НУКЛЕОФИЛЬНЫЕ ГРУППЫ В ФЕРМЕНТАХ

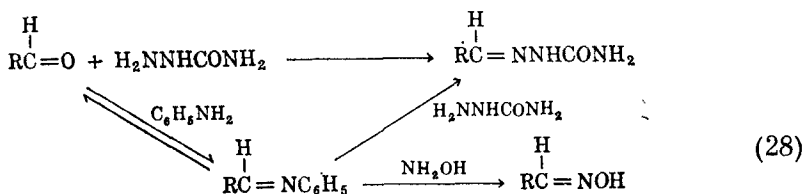
В ряде случаев было показано, что функциональные группы, которые удалось идентифицировать в качестве действующих нуклеофильных агентов в ферментативных реакциях, действительно обладают свойствами, необходимыми для этой роли. Так, гидроксильная группа N-ацетилсеринамида (модель гидроксильной группы серина в ферменте) реагирует с ацилпроизводными примерно на три порядка быстрее, чем вода (в реакциях, катализируемых основанием, вблизи нейтрального значения pH) [29]. Столь высокая реакционная способность обусловлена тем, что в отличие от воды (pK_a 15,7) [34] данная гидроксильная группа легко ионизируется (pK_a 13,6), образуя реакционноспособный кислородсодержащий анион, тогда как гидроксиль-

ный ион и другие сильно основные алкоксильные анионы обладают необычайно низкой нуклеофильной способностью [35]. Последнее обстоятельство не получило до сих пор удовлетворительного объяснения. Алкоксильный ион серина, по-видимому, удовлетворяет всем требованиям своей роли в активном центре фермента. Он является более сильным основанием, чем имидазол, и поэтому легче образует промежуточное ацилированное соединение даже с неактивированными ацилпроизводными. В результате образуется О-ацилсерин—сложный эфир средней реакционной способности, обладающий той реакционной способностью, которую и следует ожидать для сложного эфира, содержащего в спиртовом остатке электронооттягивающие заместители [29]. В частности, с аминами он реагирует значительно быстрее этилацетата, причем его реакции с аминами и с водой в присутствии имидазола протекают по типу общесосновного катализа. По-видимому, этот механизм отражает роль имидазольной группы и в ферментативных реакциях. Интересно отметить, что имидазол не является общесосновным катализатором в случае атаки гидроксильной группой N-ацетилсеринамида ацильных производных. Модельные реакции серина и производных О-ацилсерина протекают на много порядков медленнее ферментативных реакций, и поэтому для объяснения каталитической активности фермента необходимо привлечь другие факторы. Если под действием 8 М раствора мочевины развернуть молекулу ацилхимотрипсина, то реакционная способность его обратимо понизится до уровня модельных соединений; фактически это является одним из доказательств того, что ацилфермент представляет собой ацилпроизводное серина [6, 29].

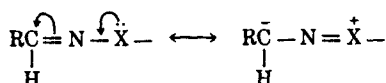
Тиоловая группа — активный нуклеофильный реагент в папаине и родственных ему ферментах — обладает высокой собственной реакционной способностью, которая обусловлена, во-первых, ее относительно высокой кислотностью ($pK_a \sim 9$), что облегчает ионизацию с образованием реакционной анионной формы, и, во-вторых, высокой нуклеофильной реакционной способностью самого аниона, которая на один-два порядка превышает реакционную способность «обычных» кислород- или азотсодержащих соединений, обладающих сравнимой основностью [36, 37]. В качестве ацилированного промежуточного соединения образуется эфир тиоловой кислоты, который своей реакционной способностью по отношению к гидроксильному иону во многом близок к кислородным сложным эфирам; однако в реакции катализируемого кислотой гидролиза он проявляет меньшую реакционную способность [38]. Примечательно, что тиоловые сложные эфиры легко реагируют со слабоосновными нуклеофильными реагентами, такими, как амины, в условиях, когда обычные кислородсодержащие сложные эфиры в реакцию не вступают [39, 40].

3. РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА КАРБОНИЛЬНОЙ ГРУППЫ

Примером нуклеофильного катализа в реакции с участием карбонильной группы является катализ анилином образования семикарбазона из бензальдегида {уравнение (28)} [41].



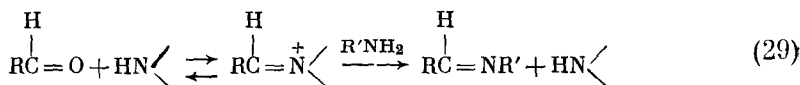
Реакция протекает через промежуточное образование основания Шиффа из анилина и бензальдегида, что является скоростью определяющей стадией. На это указывает равенство скоростей образования семикарбазона и оксима в присутствии анилина и семикарбазида или гидроксилamina. Катализ этих реакций обусловлен тем, что образование основания Шиффа с анилином является *кинетически* быстрым, однако *термодинамически* невыгодным, и поэтому промежуточный продукт в реакции не накапливается, а быстро реагирует с акцептором карбонильной группы, образуя конечный продукт. Следует ожидать, что на относительную стабильность промежуточного и конечного соединений должно влиять резонансное взаимодействие свободной электронной пары азота с фенильной группой анилина в основании Шиффа и резонансное взаимодействие соседней электронодонорной группы в оксime или семикарбазоне (IV). Повышенная реакционная способность



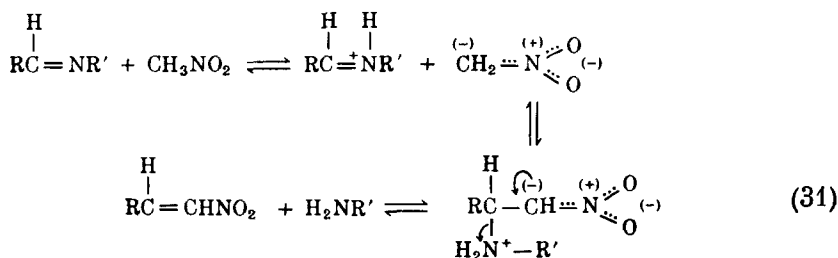
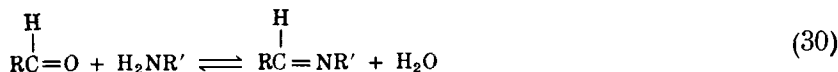
IV

промежуточного основания Шиффа по отношению к нуклеофильной атаке акцептором карбонильной группы является в значительной степени отражением легкости протонизации основания Шиффа (pK_a которого обычно на 2—3 единицы меньше исходного амина) по сравнению с исходным альдегидом (pK_a которого около —7). И хотя протонированный альдегид, несомненно, более реакционноспособен, чем соответствующее протонированное основание Шиффа, легкость, с которой оно протонируется, вполне компенсирует различия в их реакционной способности.

На первой стадии ферментативных реакций аминокислот, протекающих с участием пиридоксальфосфата в качестве кофермента, происходит конденсация аминокислоты и кофермента с образованием основания Шиффа. Если скорость этой стадии приблизительно такая же, как и скорости последующих, то это значит, что на этой стадии должен происходить катализ ферментом, так же как и на более трудных стадиях расщепления C—C и C—H связей [42]. Следовательно, тот факт, что пиридоксальфосфат существует обычно в виде основания Шиффа с аминогруппой остатка лизина, входящего в активный центр фермента, является выгодным, поскольку следует ожидать, что основание Шиффа реагирует с аминокислотой в реакции трансиминирования («траншиффикации») быстрее, чем реагировал бы свободный пиридоксальфосфат. То, что амины действительно способны катализировать реакцию переноса карбонильной группы, было показано на примере неферментативной реакции пиридоксальфосфата с семикарбазидом. Особенно эффективными катализаторами являются вторичные амины типа морфолина и пролина, которые образуют в качестве промежуточного соединения высокореакционный катион-имин {схема (29)} [42].



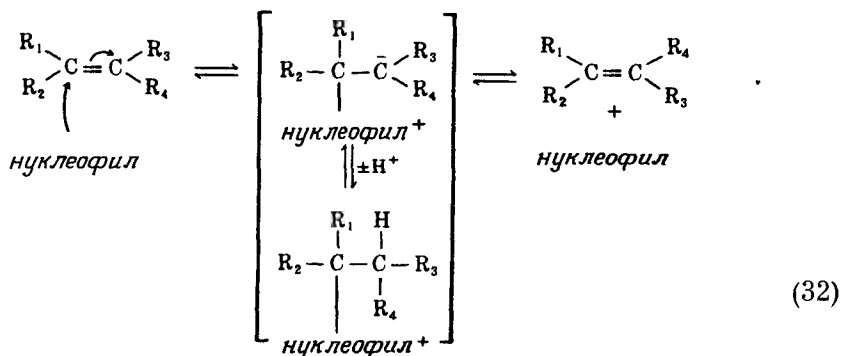
Реакция пипероналя с нитрометаном, катализируемая ацетатом *n*-бутиламмония [схемы (30) и (31)], представляет собой пример катализа аминокислоты C—C-конденсации [43]. Скорости реакций (30) и (31) были измерены раздельно и на их основании можно объяснить значение суммарной скорости каталитической реакции. Скорость аналогичной реакции конденсации ванилина с нитрометаном, катализируемой ацетатом аммония, уменьшается при добавлении кислоты или основания в условиях, когда скорость



реакции определяет преимущественно вторая стадия [схема (31)]. Последнее позволяет предположить, что переходное состояние этой стадии имеет нулевой суммарный заряд и возникает, по-видимому, либо в результате атаки протонированного основания Шиффа анионом нитрометана, либо в результате деаминирования продукта присоединения через промежуточный цвиттер-ион [44].

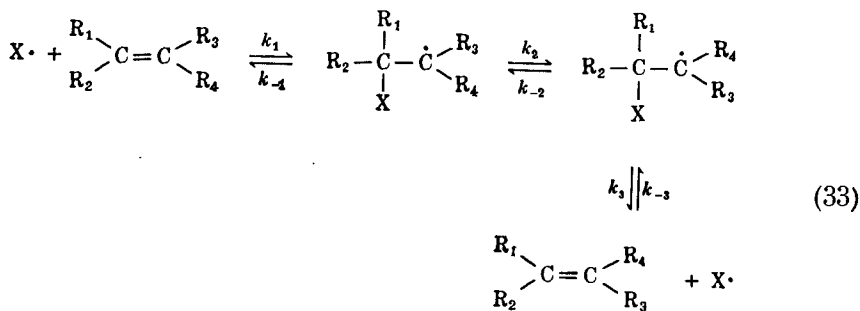
4. ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРИЗАЦИЯ

цис-транс-Изомеризация часто происходит по механизму нуклеофильного катализа. Так, катализ аминами и спиртами изомеризации этил-*цис*- α -циано- β -*о*-метоксифенилакрилата включает присоединение катализатора к двойной связи с образованием насыщенного промежуточного соединения, которое после поворота вокруг соответствующей связи отщепляет атакующую группу с образованием *транс*-продукта {схема (32)} [45]. Относительные скорости реакции в бензоле при 40° С, равные 7,5; 0,106 и 0,0106 в случае катализа ди-*н*-бутиламином, трибутиламином и пиридином, соответственно отражают влияние стерического эффекта и основности молекул катализатора. Тот факт, что эффективным катализатором является и третичный амин, позволяет предположить, что реакция может протекать через образование промежуточного цвиттер-иона без переноса протона к анионному



атому углерода. Вероятно, однако, в других реакциях, в которых карбанион менее стабилен, протонизация промежуточного соединения происходит до завершения вращения и отщепления атакующей группы. Катализируемая ферментом изомеризация малеилпирувата до фумарилпирувата протекает с участием глутатиона. Как в ферментативной, так и в неферментативной реакциях, протекающих в дейтериевой воде в присутствии глутатиона, не происходит включения дейтерия из среды. Поэтому можно предположить, что эти реакции протекают по механизму (32) в результате присоединения

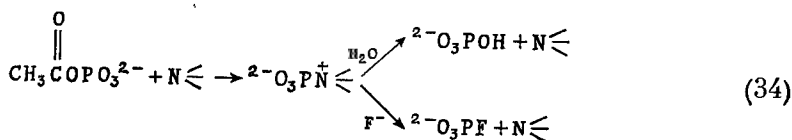
тиол-аниона по двойной связи, однако без присоединения протона к промежуточному карбаниону [46]. Свободнорадикальное присоединение иодида, тиолов и окиси азота (NO) также вызывает изомеризацию. Изомеризация олефинов, катализируемая этими соединениями, протекает по механизму присоединения с образованием промежуточного свободного радикала, в котором возможно вращение. Продукт изомеризации образуется в результате реакции отщепления [схема (33)]



В зависимости от стабильности промежуточного продукта присоединения скорость определяющей стадией может быть либо присоединение, либо вращение [47].

5. ПЕРЕНОС ФОСФАТНОЙ ГРУППЫ

Реакции монозамещенных фосфатов подвержены нуклеофильному катализу в значительно меньшей степени, чем реакции ацилпроизводных. Это обусловлено тем, что монозамещенные фосфаты относительно слабо различаются по своей чувствительности к действию различных нуклеофильных реагентов, а фосфорилзамещенное промежуточное соединение не обнаруживает достаточной избирательности по отношению к различным акцепторам фосфорильной группы, в результате чего вместо реакции переноса фосфорильной группы преобладает реакция гидролиза. В разд. В,1 было указано на нуклеофильный катализ имидазолом в ферментативных и неферментативных реакциях. Умеренными катализаторами реакций гидролиза и реакций переноса фосфатной группы из активированных фосфатных соединений (таких, как ацетилфосфат и амиды фосфорной кислоты) являются третичные амины, например пиридин и триэтилендиамин [32, 48, 49]. Проведение реакции в присутствии фторида позволяет зафиксировать промежуточное соединение реакции ацетилфосфата с триэтилендиамином в виде фторфосфата. Это служит подтверждением того, что реакция действительно протекает по механизму нуклеофильного катализа (а не общесосновного катализа) и что нуклеофильный катализ переноса фосфата может протекать с таким же успехом, как и гидролиз, если только молекула акцептора является достаточно сильным нуклеофилом по отношению к фосфату {схема (34)} [49].



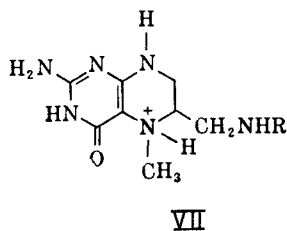
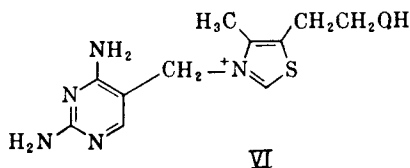
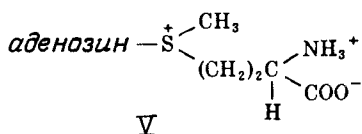
Промежуточное соединение—фосфорилированный третичный амин обладает значительно большей стабильностью, чем промежуточное соединение реакции переноса ацильной группы. Так, фосфорилированный 4-метилпиридин

имеет время полупревращения примерно 5 мин при 25 °С, а фосфорилированный N-метилимидазол почти 10 ч при 39 °С [32]. У соответствующих им ацетилпиридиния и ацетилимидазолия время полупревращения составляет всего лишь 2 и ~20 с соответственно. Значительно большая стабильность обычных ациламидов по сравнению с амидами фосфорных кислот обусловлена высокой степенью резонансной стабилизации ацилпроизводных. В амидах фосфорных кислот, а также в ацилированных или фосфорилированных третичных аминах резонансная стабилизация либо менее существенна, либо невозможна. Именно поэтому эти соединения обнаруживают более высокую реакционную способность.

6. РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА АЛКИЛЬНОЙ ГРУППЫ

Катализируемый иодидом сольволиз бромистого метила является примером нуклеофильного катализа реакции с участием *алкильной* группы [50]. Как и в других случаях, для катализа необходимо, чтобы катализатор был эффективным нуклеофильным реагентом и являлся хорошей уходящей группой, и, кроме того, необходимо, чтобы промежуточное соединение было термодинамически нестабильным по сравнению с продуктами. Сульфит-ион катализирует реакцию переноса активированной метиленипиримидиновой части тиамина (через промежуточную сульфокислоту) на ряд азотистых оснований [51]. Эту же реакцию катализирует фермент тиаминаза [52], однако о механизме действия тиаминазы или других ферментов, катализирующих перенос алкильной группы, почти ничего неизвестно.

Так как алкильные соединения по сравнению с ацил- или карбонил-производными сравнимой структуры характеризуются более низкой реакционной способностью по отношению к большинству нуклеофильных реагентов, то для достижения разумных скоростей превращения этих соединений в химических и биохимических системах необходима значительно большая степень их активации. Алкильные группы, которые подвергаются переносу в биологических системах, связаны обычно с атомом, несущим фактический или потенциальный положительный заряд, как, например, в сульфониевом ионе S-аденозилметионина (V), тиазолиевом ионе тиамина (VI) и (протонированной) 5-метилтетрагидрофолевой кислоте (VII).



Г. НУКЛЕОФИЛЬНАЯ РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ

Чтобы понять некоторые важные детали переходных состояний химических реакций, необходимо проанализировать те факторы, которые оказывают влияние на нуклеофильную реакционную способность различных соединений, и особенно те, которые обуславливают так называемую ано-

мальную нуклеофильность. Хотя в ферментативных реакциях такое подробное рассмотрение пока еще не осуществимо, можно думать, что оно должно пролить некоторый свет на механизмы, при помощи которых ферменты способствуют ускорению нуклеофильных процессов.

В нуклеофильных реакциях происходит передача электронов от нуклеофила к субстрату с образованием в переходном состоянии некоторого подобия химической связи [схема (35)]



Наиболее плодотворный эмпирический подход к изучению природы этих процессов основан на сравнении энергии, которая необходима для образования переходного состояния в ряду различных нуклеофилов и субстратов, с энергией других кинетических или равновесных процессов. В зависимости от степени наблюдаемой корреляции можно судить о том, действительно ли протекание обоих процессов обуславливает те же факторы и насколько переходное состояние напоминает переходное состояние модельной реакции. Корреляции такого рода особенно распространены при сравнении свободных энергий различных равновесных и кинетических процессов. Величины этих энергий прямо пропорциональны *логарифмам* констант равновесия или скорости [уравнения (36) и (37)]. Уравнение (37) следует из теории абсолютных скоростей реакций, где $K^\ddagger$ — константа псевдоравновесия для образования переходного состояния,

$$\Delta F = -RT \ln K, \quad (36)$$

$$\Delta F^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger = -RT \ln \frac{h}{k_B T} k, \quad (37)$$

h и k_B — константы Планка и Больцмана соответственно и k — наблюдаемая константа скорости реакции. Использование таких *линейных* (и *нелинейных*) *корреляций между свободными энергиями* различных процессов — одно из наиболее верных средств для изучения механизмов реакций.

В случае нуклеофильных реакций простейшей корреляцией такого типа является сравнение скоростей одного ряда реакций с данными, полученными для другого ряда. Эту связь можно записать в виде уравнения Свейна — Скотта [уравнение (38)]

$$\log \frac{k}{k_0} = sn \quad (38)$$

где k — константа скорости данной реакции в исследуемом ряду реакций, k_0 — константа скорости реакции сравнения в этом же ряду, s — мера чувствительности субстрата к нуклеофильной реакционной способности атакующего реагента и n — мера нуклеофильной реакционной способности, найденная в ряду реакций, с которым сравнивается исследуемый реакционный ряд [53]. В табл. 6 приведены значения n для нескольких нуклеофильных реагентов, рассчитанные на основании главным образом констант скоростей реакций замещения при насыщенном атоме углерода. Там же приведены и некоторые значения $\log k/k_0$ для нуклеофильного замещения при насыщенном атоме углерода в β -пропиолактоне. Скорости реакций, переходное состояние которых имеет подобное же строение, хорошо коррелируют с этим уравнением, причем значения s и n для таких реакций дают информацию о природе небольших различий в переходных состояниях (например, о различной степени образования связи). Если сравнивать разнотипные реакции, такие, как атака насыщенного атома углерода и атака карбонильной группы, то корреляция часто отсутствует. Это значит, что переходные состояния разнотипных реакций существенно различаются. На основании характера отклонений от корреляции, наблюдаемой с разными нуклеофильными реагентами, можно судить иногда о природе различий в переходных состояниях.

Таблица 6

Значения параметров Свейна — Скотта (n), характеризующих нуклеофильную реакционную способность [53]

Соединение	n	$\log k/k_0$ для β -пропио- лактона
H ₂ O	0	0
CH ₃ COO ⁻	2,72	2,49
Cl ⁻	3,04	2,26
Br ⁻	3,89	2,77
N ₃ ⁻	4,00	—
HO ⁻	4,20	(6,08) ^a
C ₆ H ₅ NH ₂	4,49	—
SCN ⁻	4,77	3,58
I ⁻	5,04	3,48
S ₂ O ₃ ²⁻	6,36	5,28

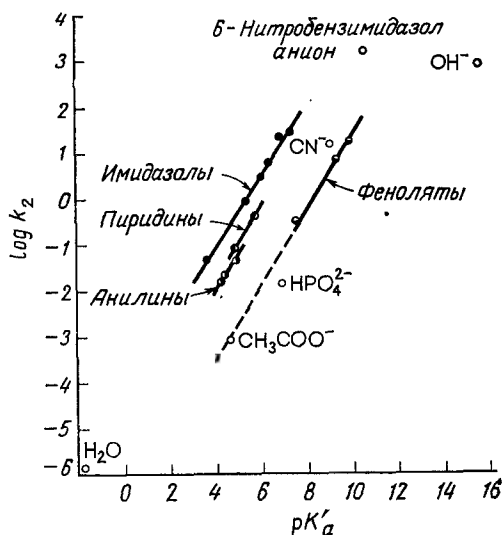
^a При атаке ацильной группы.

1. ОСНОВНОСТЬ

Присоединение протона к нуклеофилу [схема (39)]



безусловно, можно считать модельным процессом, который полезно сравнить с процессом псевдоравновесного образования переходного состояния по схеме (35). Основность — это мера способности соединения отдавать пару электронов протону с образованием частично ковалентной, частично ионной связи при одновременном возникновении положительного заряда на основании. Поэтому следует ожидать, что между этим процессом и отдачей электронов субстрату в переходном состоянии реакции (при этом на нуклеофиле также образуется частичный положительный заряд) должна существовать корреляция. В некоторых реакциях с участием структурно подобных нуклеофилов, если рассматривать соединения, не слишком различающиеся по реакционной способности, наблюдается хорошая корреляция между реакционной способностью нуклеофилов и их основностью. Такого рода корреляция была обнаружена для реакции сложного эфира (n -нитрофенилацетат) с рядом нуклеофилов, таких, как имидазолы, пиридины, анилины и анионные кислородсодержащие нуклеофилы (рис. 6). В ограниченной области основность

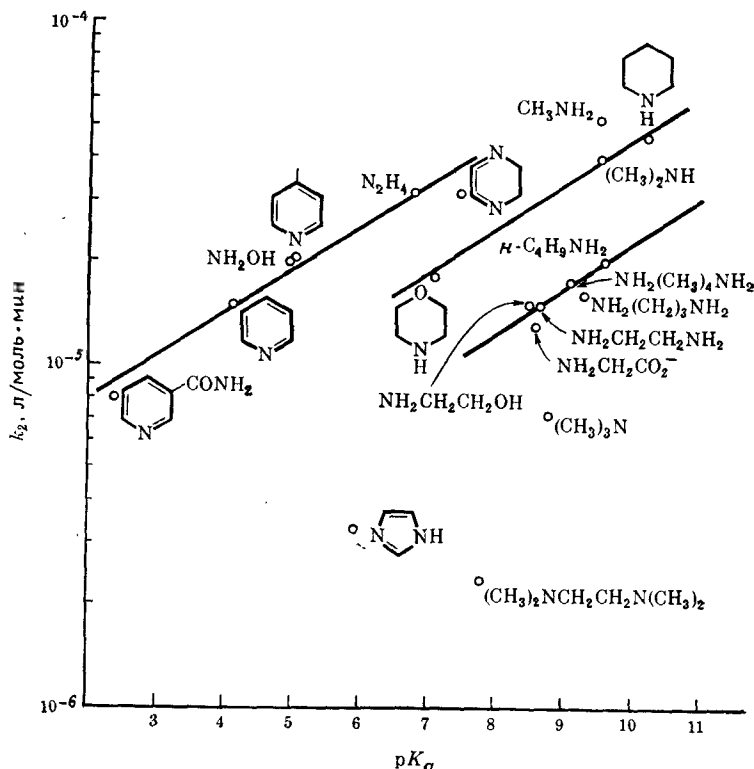


Р и с. 6. Влияние основности имидазолов, пиридинов, анилинов и кислородсодержащих анионов на их реакционную способность по отношению к n -нитрофенилацетату в 28,5%-ном этаноле при 30 °C [54].

хорошо коррелирует с нуклеофильностью, однако разные классы нуклеофилов в координатах рис. 6 дают разные линии [54]. Наблюдаемую зависимость можно записать в виде уравнения Брэнстеда (40)

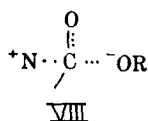
$$\log \frac{k}{k_0} = \beta pK + C, \quad (40)$$

которое с одинаковым успехом приложимо как к нуклеофильным реакциям, так и к общему кислотно-основному катализу. Для рассмотренных реакций угол наклона прямых β равен 0,8. Последнее свидетельствует, что эти реакции



Р и с. 7. Влияние основности аминов на их реакционную способность по отношению к дианиону *n*-нитрофенилфосфата при 39°. Значения для диаминов исправлены на статистический фактор 2 как в случае наблюдаемых значений K_a , так и k_2 [33].

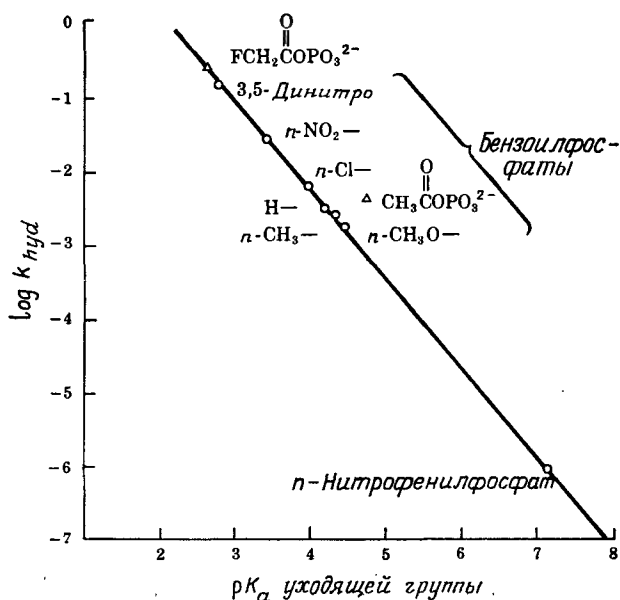
сильно зависят от основности и, следовательно, процесс протонирования основания можно рассматривать как хорошую модель переходного состояния нуклеофильной реакции. Кроме того, следует заключить, что в переходном состоянии на нуклеофиле образуется значительный положительный заряд и само переходное состояние этих реакций выглядит, по-видимому, так, как это показано на схеме VIII



(Более детально эта реакция рассмотрена в гл. 10, разд. Б.9.)

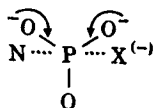
В отличие от реакций с участием ацилпроизводных реакции монозамещенных фосфатов очень мало чувствительны к основности нуклеофильного реагента. На рис. 7 показана зависимость констант скоростей реакции дианио-

на *n*-нитрофенилфосфата с различными аминами от их основности [33]. Константы скорости для различных классов аминов ложатся на разные прямые в зависимости от стерических условий и степени замещения атома азота в молекуле амина, однако внутри данного класса аминов зависимость от основности слабая (наклон, представленный в координатах уравнения Брэнстеда, составляет лишь $\sim 0,2$). На этом основании можно предположить,



Р и с. 8. Влияние кислотности уходящей группы на скорости гидролиза дианионов ацилфосфатов и *n*-нитрофенилфосфата [33].

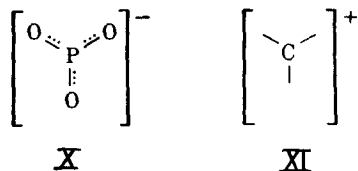
что в переходных состояниях этих реакций связь между нуклеофилом и субстратом почти не возникает, а на атакующем амине практически не возникает положительного заряда. Фактически реакции монозамещенных фосфатов почти не обнаруживают никакой чувствительности к любому изменению свойств нуклеофила, за исключением стерических эффектов. С другой стороны, эти реакции исключительно чувствительны к природе уходящей группы, а именно зависимость скорости гидролиза ряда фосфат-дианионов от основности уходящей группы характеризуется углом наклона β , равным $-1,2$ (рис. 8). Аналогично высокую чувствительность обнаруживают и реакции, которые, несомненно, включают атаку нуклеофильным реагентом [32, 33]. На основании этих фактов следует предположить, что переходное состояние реакции похоже на структуру, приведенную на схеме IX. Эта схема показы-



IX

вает, что связь со стороны атакующего нуклеофила образуется лишь в незначительной степени, в то время как связь с уходящей группой оказывается почти разорванной. В этом случае главной движущей силой реакции, способствующей вытеснению уходящей группы, является подача на нее электронов с отрицательных зарядов кислородных атомов. Эти реакции анало-

гичны некоторым реакциям иона карбония в химии углерода; переходное состояние IX своим дефицитом электронов походит на мономерный гипотетический метафосфат-моноанион X, аналогично иону карбония XI в химии углерода



Сравним кинетические характеристики реакций, протекающих при заданном значении pH (в случае ферментативных реакций это будет нейтральное значение pH). Нуклеофильная реакционная способность оснований, для которых pK ниже pH, при котором проводится эксперимент, будет меняться

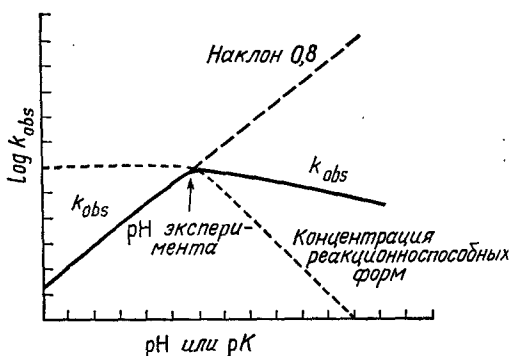


Рис. 9. Диаграмма зависимости реакционной способности нуклеофила при заданном значении pH от его основности. На реакционную способность оказывают влияние следующие два фактора: увеличение реакционной способности при увеличении основности и уменьшение доли нуклеофила, присутствующего в виде реакционноспособного свободного основания, по мере того как значение pK становится больше, чем pH, при котором исследуют реакцию.

в соответствии с уравнением Брёнстеда в зависимости от коэффициента β для данной реакции (это показано на рис. 9, где угол наклона β принят равным 0,8). Нуклеофильные реагенты, для которых pK выше pH, при котором проводится эксперимент, будут обладать большей реакционной способностью, если они реагируют в виде свободного основания. Однако концентрация свободного основания будет при этом меньше общей концентрации нуклеофила, поскольку в условиях опыта он будет частично протонирован. В этом случае наблюдаемая зависимость реакционной способности от pK_a нуклеофила при данном pH эксперимента будет определяться линией с углом наклона, равным сумме наклона зависимости Брёнстеда и наклона, равного $-1,0$, который описывает уменьшение доли нуклеофила в виде свободного основания при увеличении его значения pK. Если $\beta = 0,8$, наблюдаемая реакционная способность сильноосновных нуклеофилов будет уменьшаться с увеличением основности с углом наклона равным 0,2, как это показано на рис. 9. В случае реакций, которые в меньшей степени зависят от основности, уменьшение будет соответственно более значительным. Трудно ожидать, что в ферментах большое изменение реакционной способности какой-либо группы, относящейся к активному центру, связано с изменением ее основности. Важно другое, а именно участие в реакции таких групп, как имидазол, которые имеют pK вблизи значений pH, оптимальных для действия

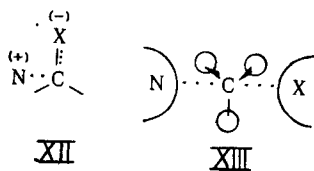
фермента, что обеспечивает их максимальную нуклеофильность при данной основности. Тот факт, что зависимость, описываемая уравнением Брэнстеда, не является линейной, а достигает насыщения для сильноосновных кислородсодержащих анионных нуклеофилов, означает, что при нейтральных значениях рН эффективная реакционная способность таких нуклеофилов будет особенно низкой. Это обусловлено тем, что увеличение основности, которое приводит к понижению концентрации реакционной формы при нейтральных значениях рН, оказывается не скомпенсированным увеличением реакционной способности. Именно поэтому кислородный анион серина является значительно более эффективным нуклеофилом, чем сопряженное основание менее кислых спиртов [29, 34, 35].

2. ПОЛЯРИЗУЕМОСТЬ, ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Критическое рассмотрение различных по своей природе реакций позволяет заключить, что корреляция между скоростями реакций и основностью является скорее исключением, чем правилом. Действительно, многие реакции замещения при насыщенном реакционном центре не обнаруживают никакой зависимости от основности нуклеофила, даже если рассматривать соединения, сильно отличающиеся по реакционной способности [55]. Однако такие реакции весьма чувствительны к другим свойствам нуклеофила. В этом отношении подобные реакции отличаются от реакций замещения с участием монозамещенных фосфатов, которые не обнаруживают почти никакой чувствительности ни к основности, ни к любым другим свойствам нуклеофила (за исключением стерических требований). Табл. 6 отражает типичный порядок нуклеофильной способности при насыщенном атоме углерода на примере реакции замещения при β -атоме углерода в β -пропиолактоне. Отметим, что иодид на порядок более реакционен, чем ион ацетата, хотя основность его, вероятно, более чем в 10^{10} раз меньше. Очевидно, переходные состояния этих реакций иные по сравнению с реакциями с участием карбонильной группы, и они не обнаруживают сходства с модельным процессом присоединения протона к нуклеофилу. Были предприняты многочисленные попытки найти тот фактор или факторы (иные, чем основность), которые коррелируют с нуклеофильной реакционной способностью в этих реакциях. Эти поиски выявили множество свойств, в большей или меньшей степени пригодных для этой цели, однако тот факт, что поиски продолжаются, указывает, что ни одна из найденных корреляций не является полностью удовлетворяющей и что до сих пор до конца не известна сущность этого явления.

Различия в переходных состояниях реакций, протекающих при насыщенном и ненасыщенном атомах углерода, легко объяснить по крайней мере *a posteriori*. В случае ненасыщенного атома углерода взаимодействие с атакующим реагентом может осуществляться за счет тех орбиталей атома углерода, которые в исходном состоянии использовались для образования π -связи. Поэтому образование связи в переходном состоянии может протекать легко и атакующий реагент будет тесно примыкать к атому углерода (XII). Это и есть одна из причин, почему реакции замещения при ненасыщенном атоме углерода (например, реакции гидролиза хлорангидридов и сложных эфиров) обычно протекают по механизму присоединения — отщепления и значительно быстрее, чем реакции замещения при насыщенном углеродном атоме (например, с участием галогеналкилов, простых эфиров). В реакциях замещения при насыщенном атоме углерода нет легкодоступных орбиталей, и поэтому в переходном состоянии атом углерода должен стать пятивалентным (XIII). *d*-Орбитали атома углерода характеризуются слишком высокой энергией, чтобы обеспечить значительную стабилизацию. Поэтому образование переходного состояния должно происходить в результате ригид-

ридизации *s*- и *p*-орбиталей, взаимодействующих с электронами пяти атомов.



В этих условиях связь образуется в значительно меньшей степени, чем при атаке ненасыщенного атома углерода, а в переходном состоянии нуклеофильный реагент будет находиться на большем расстоянии от атома углерода. Еще одним фактором, способствующим удержанию нуклеофила на некотором расстоянии при атаке насыщенного атома углерода, является большое число заместителей при атоме углерода; похоже, что пятивалентное переходное состояние XIII стерически существенно перегружено. Как уже указывалось выше, основность — это характеристика образования связи на коротком расстоянии с участием небольшого по размеру протона. Поэтому модель переходного состояния, возникающего при атаке насыщенного атома углерода, должна характеризоваться способностью нуклеофила образовывать связь (хотя бы частично) на большем расстоянии от атакуемого атома.

Наиболее полезными в этом отношении оказались уравнения Эдвардса, содержащие четыре параметра [56, 57]. Первое из этих уравнений имеет следующий вид:

$$\log \frac{k}{k_0} = \alpha E_n + \beta H. \quad (41)$$

В этом уравнении E_n — окислительный потенциал нуклеофила (равный $E^0 + 2,60$)*, H — основность нуклеофила (равная $pK_a + 1,74$)*, коэффициенты α и β отражают чувствительность субстрата по отношению к этим двум параметрам. Окислительный потенциал, определяемый полуреакцией



представляет собой меру способности нуклеофила отдавать электрон электроду. Это совершенно другой критерий электронотдающей способности, чем основность. Уравнение (42) включает также образование новой связи между двумя молекулами окисленного нуклеофила. Именно поэтому величину E_n можно рассматривать также как меру способности нуклеофила образовывать ковалентную связь.

Второе уравнение Эдвардса имеет следующий вид:

$$\log \frac{k}{k_0} = AP + BH. \quad (43)$$

Здесь P — поляризуемость нуклеофила (которую в неосложненных случаях можно определить из молекулярной рефракции), H , как и ранее, — мера основности, A и B отражают чувствительность субстрата по отношению к этим двум параметрам. Поляризуемость является мерой подвижности электронов нуклеофила. Поэтому можно ожидать, что поляризуемость сама по себе должна коррелировать со способностью нуклеофила взаимодействовать с субстратом с образованием частичной связи на большем расстоянии. Кроме того, высокая поляризуемость должна также облегчать прохождение нуклеофила через электронные облака окружающих атомов. Уравнения (41) и (43) связаны между собой, поскольку окислительный потенциал сам по себе связан с поляризуемостью и в меньшей степени с основностью эмпирическим

* Константы 2,60 и 1,74, устанавливая отношение этих величин к значениям, получаемым в воде, которые приняты равными единице.

уравнением (44), где a и b равны 3,60 и 0,062 соответственно:

$$E_n = aP + bH. \quad (44)$$

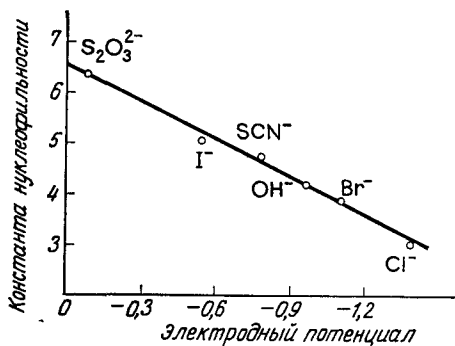
На этом основании можно полагать, что все эти корреляции представляют собой лишь часть более общей зависимости, которая включает, однако, параметры, характеризующие и другие свойства.

Уравнения Эдвардса нашли успешное применение в основном при анализе скоростей реакций нуклеофилов с насыщенным атомом углерода и некоторыми другими субстратами. Из полученных корреляций следуют небольшие значения параметров β и B , что отражает небольшую зависимость этих реакций от основности. В действительности если даже вообще не учитывать вклад основности, то и тогда наблюдаемая корреляция является довольно хорошей; в случае таких реакций существует прямая связь между окислительным потенциалом и нуклеофильными константами n по Свейну — Скотту (рис. 10). К сожалению, приложение уравнений Эдвардса к сложным молекулам встречает серьезные практические и теоретические трудности. Во многих случаях окислительный потенциал таких молекул неизвестен. Иногда окислительный потенциал может отражать распад молекулы на части или может характеризовать более сложные изменения в структуре молекулы, отличающиеся от перестроек, возникающих в переходном состоянии. Для характеристики переходного состояния важна поляризуемость молекулы лишь в определенном направлении и при том атоме, где должна образоваться новая связь, поэтому суммарная поляризуемость молекулы, усредненная по всем направлениям и относящаяся ко всем составляющим атомам, не может дать полезной информации. Нужные значения поляризуемости в общем отсутствуют, и, по-видимому, их вообще нельзя определить, за исключением случаев простейших молекул и ионов.

Ниже приведен перечень некоторых свойств, в большей или меньшей степени взаимно связанных, которые были или могут быть использованы для получения корреляций со скоростями нуклеофильных реакций:

1. Основность.
2. Окислительный потенциал.
3. Поляризуемость.
4. Потенциал ионизации.
5. Электроотрицательность.
6. Энергия наивысшей из заполненных молекулярных орбиталей.
7. Прочность ковалентной связи.
8. Размер.

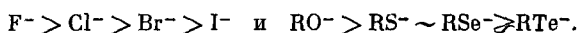
Все эти свойства являются мерой способности нуклеофила отдавать электрон и (или) образовывать ковалентную связь с субстратом на некотором расстоянии. Большинство из них с различным успехом были уже предложены в качестве параметров уравнений для определения корреляции с нуклеофильной реакционной способностью. Очевидно, указанные свойства взаимно связаны, но определить эту связь количественно трудно. Не удастся также найти какой-либо один параметр, удовлетворительно описывающий переходное состояние. Даже такой, казалось бы, неподходящий параметр, как размер нуклеофильного атома, коррелирует с нуклеофильной реакционной



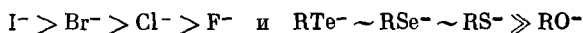
Р и с. 10. Линейная зависимость константы нуклеофильности по Свейну — Скотту от потенциала электрода [56].

способностью. Это обусловлено тем, что большие атомы удерживают свои внешние электроны относительно слабо, поэтому эти электроны поляризуются и легко переходят к электроду или «размытым» орбиталиям переходного состояния. Такое положение обусловило зарождение неточного, однако полезного термина «мягкость», который отражает способность молекулы эффективно взаимодействовать с другими «мягкими» молекулами или переходными состояниями. Этот термин имеет прямое отношение к указанным выше свойствам и противоположен понятию «жесткость», которое отражает способность молекулы взаимодействовать с другой «жесткой» молекулой, такой, как протон [58].

Разделение доноров и акцепторов электрона на жесткие и мягкие является развитием ранних представлений о разделении лигандов и ионов металлов на классы А и В [59]. Жесткие лиганды (тип А) содержат концентрированный отрицательный заряд и могут эффективно взаимодействовать с малыми ионами металлов (также несущими концентрированный заряд, как, например, Mg^{2+} , Al^{3+}) и протоном. Порядок эффективности взаимодействия определяется следующими рядами:



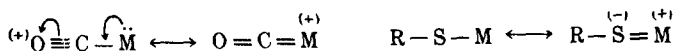
которые отражают порядок основности и абсолютной нуклеофильной реакционной способности по отношению к карбонильной группе. Мягкие лиганды (тип В) являются большими, поляризуются и эффективно взаимодействуют с большими ионами металлов, несущими «размытый» заряд, такими, как Cu^{2+} , Pt^{2+} и Hg^{2+} . Порядок эффективности взаимодействия для них следующий:



Чувствительность насыщенного атома углерода к мягкости нуклеофила в переходном состоянии будет находиться где-то в середине этой шкалы. Чувствительность насыщенного атома углерода к мягкости нуклеофила в переходном состоянии значительно превосходит чувствительность карбонильного углерода, однако она меньше, чем в случае некоторых металлов. В общем жесткость приводит, как правило, к преимущественно ионному, а мягкость — к преимущественно ковалентному характеру связи или переходного состояния. Кроме того, мягкие атомы с высокой поляризуемостью стабилизируются силами Ван-дер-Ваальса или Лондона в результате взаимодействия их в молекулах исходных соединений или в переходных состояниях с другими атомами, отличающимися от тех, с которыми они непосредственно связаны или взаимодействуют.

Термины «жесткий» и «мягкий» уже подвергались критике вследствие их неточности и в связи с тем, что их нельзя определить количественно [60]. Тем не менее от таких терминов нельзя отказаться, пока истинная природа свойств, определяющих реакционную способность, еще не понята. Существует потребность в некотором общем термине, охватывающем все факторы, определяющие тенденции к повышенной нуклеофильной реакционной способности, которая в общем случае отличается от величины, коррелирующей с основностью нуклеофила, и которую нельзя удовлетворительно описать при помощи единого количественного параметра.

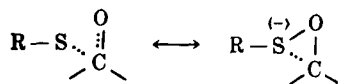
Одной из характеристик многих мягких нуклеофилов и лигандов является доступность незанятых d - или π -орбиталей. С этими орбиталями может взаимодействовать электронная пара субстрата или металла. Такого рода связь металлов с окисью углерода или серой показана на схемах XIV и XV



XIV

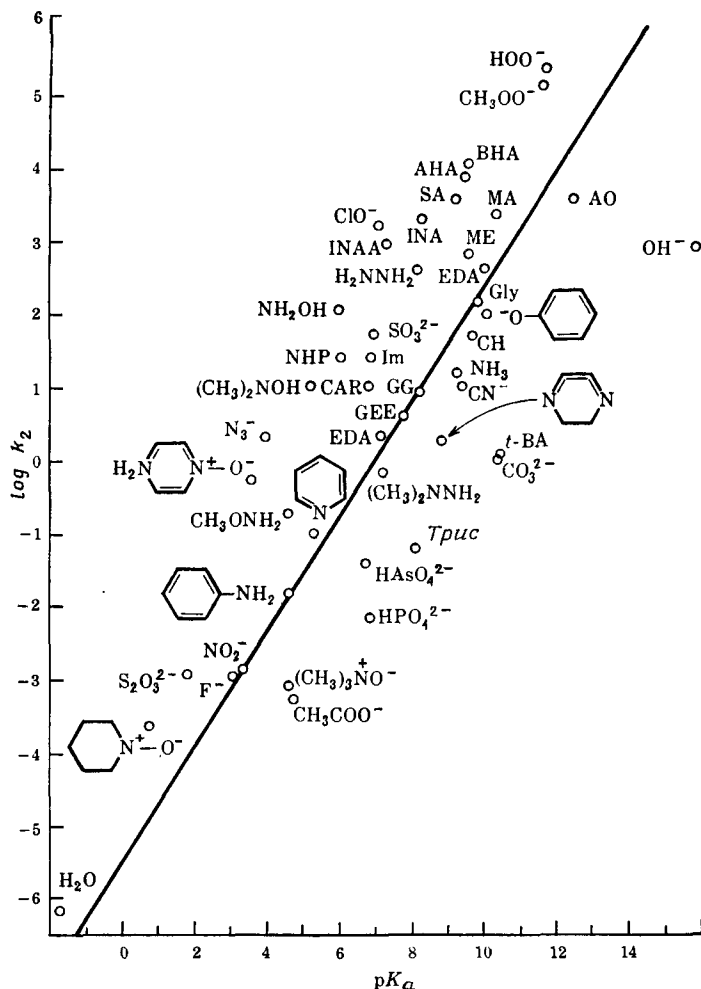
XV

Менее надежно установлено, что такое взаимодействие вносит вклад в нуклеофильную реакционную способность, однако оно позволяет дать заманчивое объяснение тому неожиданному факту, что скорость атаки ацетальдегида анионами тиола (XVI) почти не чувствительна к основности [61].



XVI

Несмотря на то что абсолютная нуклеофильная реакционная способность мягких поляризуемых молекул по отношению к карбонильным соединениям



Р и с. 11. Реакционная способность широкого ряда различных нуклеофилов по отношению к *n*-нитрофенилацетату при 25°C как функция их основности.

ВНА — бутирогидроксамат; АНА — ацетогидроксамат; INA — изонитрозоацетон; SA — салицилальдоксим; MA — меркаптоацетат; ME — меркаптоэтанол; AO — ацетонсим; GLY — глицин; INAA — изонитрозоацетилацетон; EDA — этилендиамин (свободное основание или монокатион); NHP — N-оксифталиимид; IM — имидазол; CH — анион хлоральгидрата (30 °C); CAR — карнозин; GG — глицилглицин; GEE — этиловый эфир глицина; *t*-BA — *трет*-бутиламин [36].

в общем случае мала (вследствие относительно слабой основности этих молекул), тем не менее переходные состояния реакций с участием карбониль-

ной группы в некоторой степени чувствительны к мягкости атакующего реагента. Так, отклонения, наблюдаемые для некоторых реакций от простой линейной зависимости между нуклеофильностью и основностью, часто можно объяснить мягкостью или поляризуемостью нуклеофила. На рис. 11 приведена в качестве функции основности нуклеофильная реакционная способность ряда соединений по отношению к *n*-нитрофенилацетату. Эта зависимость не столь четкая, как на рис. 6, поскольку сюда включены нуклеофильные реагенты, сильно различающиеся по структуре. На рисунке прямая линия с углом наклона 0,8 проведена через точки, соответствующие простым первичным аминам, которые вполне удовлетворительно соответствуют этой зависимости. Положительные отклонения от этой линии (наблюдаемые также и в случае аналогичных корреляций для других реакций с участием анионов тиолов, гидроперекисей и азидов, а также стерически незатрудненных третичных аминов) можно приписать, по крайней мере частично, «мягкости» или поляризуемости этих реагентов; наоборот, отрицательные отклонения, наблюдаемые для кислородсодержащих анионов, таких, как фосфат, карбонат и ацетат, отчасти могут отражать относительную «жесткость» этих нуклеофилов.

3. СОЛЬВАТАЦИЯ

Совсем другим фактором, который, однако, в некоторой степени связан с предыдущими, является сольватация. Сольватация может оказывать исключительно сильное влияние на нуклеофильную реакционную способность [62].

Таблица 7

Скорости реакций замещения в молекуле
метилиодида [63]

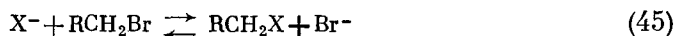
Нуклеофил	Константа скорости реакции	
	в воде	в диметилформамиде
LiI	$1,6 \cdot 10^{-5}$	
LiBr	$0,18 \cdot 10^{-5}$	0,11
LiCl	$0,010 \cdot 10^{-5}$	0,13
KF	$0,007 \cdot 10^{-5}$	>0,1

Порядок нуклеофильной реакционной способности для реакции S_N2 -замещения метилиодида в воде является следующим: $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$, однако в апротонном растворителе диметилформамиде различия становятся слабыми и появляется даже тенденция к обратной последовательности (табл. 7) [63]. Более того, абсолютное значение скорости реакции с участием иона Cl^- становится в диметилформамиде в $1,3 \cdot 10^8$ раз больше, чем в воде. Еще более сильное влияние растворителя на скорость реакции было обнаружено в катализируемом метоксильными ионами процессе обмена протонов, расположенных в молекуле рядом с активирующей циано-группой, сложноэфирной или амидной группой. В этом случае в апротонном растворителе диметилсульфоксиде скорость возрастает в 10^9 раз по сравнению с метанолом [64].

Энергия сольватации ионов при переходе из газовой фазы в воду (от -60 до -120 ккал/моль для галоген-анионов [65]) превышает на несколько порядков те относительно небольшие различия в свободной энергии активации, которые следуют из наблюдаемых скоростей реакций. Если же анион действует как нуклеофил, который замещает уходящую группу или отрывает

протон, то он должен потерять большую часть заряда и сольватной оболочки не только при образовании продукта реакции, но также в значительной степени и в переходном состоянии. Это объясняется тем, что взаимодействие с субстратом возможно лишь при удалении молекул растворителя. Примеры, которые были приведены выше, показывают, что эти различия в сольватации могут быть достаточно большими, чтобы оказать решающее влияние на скорость нуклеофильной реакции. Анион небольшого размера с высокой плотностью заряда (например, F^- или CH_3O^-) значительно менее стабилен в апротонном растворителе, чем в воде, где его заряд может быть делокализован в результате образования водородных связей с растворителем. Следовательно, по сравнению с большим ионом, для которого влияние сольватации менее существенно, ион небольшого размера охотнее будет присоединять протон или входить в переходное состояние именно в апротонном растворителе. Это проявляется и в увеличении его основности и нуклеофильности. По тем же причинам природа растворителя оказывает сильное влияние на ряд других свойств ионов, в том числе и на их растворимость, основность и спектральные свойства [66].

Различия в сольватации основных состояний ионов простейшим образом можно оценить при исследовании равновесия, приведенного в виде уравнения (45), где сравниваются относительные способности различных галогенид-ионов вытеснять бромид из стандартного субстрата. Константы равновесия для реакции



приведены в табл. 8. Из этих данных следует, что оба растворителя (вода и нитробензол) ведут себя по-разному, причем вода сглаживает различия между ионами. Это можно объяснить относительно большей дестабилизацией меньших по размеру анионов в нитробензоле по сравнению с водой [67].

Таблица 8

Константы равновесия реакции
 $X^- + RCH_2Br \rightleftharpoons RCH_2X + Br^-$, протекающей
 в нитробензоле и в воде [67]

X^-	C_4H_9Br в нитро- бензоле	CH_3Br в воде
Cl^-	$1,5 \cdot 10^2$	10
Br^-	1	1
I^-	$2 \cdot 10^{-2}$	13

Разницу в свободных энергиях основных состояний ионов в разных растворителях можно получить из некоторых последних работ и обзоров; эти различия являются столь большими, что они могут привести к разнице в константах скорости или равновесия в 10^{17} раз, если принять, что эти различия полностью исчезают в переходном состоянии или при образовании продукта реакции [68]. Особенно значительны эти различия в случае малых анионов, которые плохо сольватированы в апротонных растворителях. Тем не менее различия между катионами также являются существенными, и, кроме того, имеются данные, которые указывают, что даже очень большие ионы специфически взаимодействуют как с апротонными, так и протонными растворителями [68, 69].

Трудно четко разграничить эффект сольватации от тех свойств, которые объединяет термин «мягкость». Так, большие мягкие ионы отличаются тем, что легко теряют сольватную оболочку и вступают в реакцию. Поэтому с достаточной очевидностью можно лишь утверждать, что, во-первых, соль-

ватация основного состояния имеет большое значение для определения нуклеофильной реакционной способности, во-вторых, сольватация — это не единственный фактор, определяющий нуклеофильную реакционную способность. Большие различия в *относительной* нуклеофильной реакционной способности разных соединений по отношению к многим субстратам нельзя объяснить разницей в сольватации нуклеофила. В тех корреляциях, которые существуют между нуклеофильной реакционной способностью и основностью, сольватационные эффекты, по всей видимости, существенно скомпенсированы, поскольку анион должен терять сольватную оболочку как при присоединении протона, так и при образовании переходного состояния реакции. Положительные отклонения от таких зависимостей, наблюдаемые для незаряженных нуклеофилов и анионов тиолов, гидроперекисей и азидов, свидетельствуют о том, что наряду с основностью на реакционную способность оказывает влияние также и поляризуемость или мягкость. Такие отклонения чаще всего обнаруживаются в реакциях карбонильных соединений, например в реакции с участием *n*-нитрофенилацетата [76], которые очень чувствительны к основности нуклеофила. Еще большие отклонения имеют место при атаке насыщенного атома углерода. Тот факт, что порядок увеличения основности является *обратным* возрастанию нуклеофильной реакционной способности анионов F^- , Cl^- , Br^- и I^- по отношению к насыщенному атому углерода в воде (хотя сольватация аниона должна оказывать одинаковое влияние на оба эти свойства), означает, что, помимо сольватации, на протекание реакции оказывают влияние и другие важные факторы.

Природа растворителя оказывает большее влияние на скорость реакции, чем на константы равновесия при взаимодействии анионов с ионами карбония. Это значит, что протекание этих реакций определяют специфические взаимодействия растворителя с переходным состоянием, отличные от взаимодействий, которые происходят в основном состоянии. Исходя из этого, можно также предположить, что перестройка сольватной оболочки вносит непосредственный вклад в свободную энергию активации этих процессов [70].

При данной основности нуклеофильная реакционная способность аминов изменяется, как правило, следующим образом: третичный амин $>$ вторичный амин $>$ первичный амин $> NH_3$, однако этот порядок часто искажается стерическими препятствиями, которые возрастают со степенью замещенности амина [71]. В случае реакции хлорамина с образованием замещенных гидразинов, которая характеризуется относительно малыми стерическими затруднениями, относительные скорости реакции с участием триметиламина, диметиламина, метиламина и аммиака являются следующими: 1550 : 700 : 120 : 1 [72]. В то же время реакционная способность *N*-метилимидазола по отношению к *n*-нитрофенилацетату всего лишь в два раза превышает реакционную способность аммиака, хотя аммиак является в 100 раз более основным нуклеофилом.

Сильная сольватация сопряженных кислот некоторых нуклеофилов часто может служить причиной нарушения корреляции нуклеофильности с основностью. По-видимому, это является одной из причин относительно низкой реакционной способности первичных аминов и аммиака по сравнению со вторичными и третичными аминами. Можно полагать, что в этом случае увеличение силы основания, обусловленное сольватацией катиона, опережает увеличение реакционной способности, обусловленное частичной сольватацией положительного заряда, образующегося в переходном состоянии (более подробно см. гл. 3). Если коэффициент β достаточно велик, то это будет приводить к отрицательному отклонению на графике зависимости основности от нуклеофильности. Следовательно, отклонения, наблюдаемые для этих соединений, более целесообразно приписать их аномальной основности, чем их аномальной нуклеофильной реакционной способности (рис. 6, гл. 3).

Если заряженная группа, например карбоксилат-анион, находится в гидрофобной области активного центра фермента и поэтому плохо сольватирована, то ее нуклеофильная реакционная способность будет увеличенной. Однако соответственно с этим возрастает также и основность такой группы, поскольку дестабилизация аниона, обусловленная плохой сольватацией, должна способствовать любому процессу, который понижает заряд на анионе. Этот эффект объясняет, по-видимому, высокие значения pK (вплоть до 7 и более) для «замаскированных» карбоксильных групп в ферментах и других белках [73], и, хотя данный эффект способствует увеличению нуклеофильности этих групп, соотношение нуклеофильности и основности остается практически неизменным. Следовательно, на основании этого эффекта вряд ли можно ожидать больших ускорений, если только нуклеофил не защищен от протонирования под действием растворителя и в то же время сохраняет свободу для атаки субстрата. Это возможно в том случае, когда присоединение субстрата к ферменту вызывает конформационное изменение, в результате которого нуклеофил становится доступным и атакует субстрат в гидрофобной среде. Это может служить еще одним примером, когда силы связывания между ферментом и субстратом используются для продвижения системы вдоль координаты реакции, что облегчает каталитический процесс при одновременном уменьшении наблюдаемой свободной энергии связывания (более подробно этот вопрос будет рассмотрен в гл. 5 в рамках теории индуцированного напряжения). В общем случае, когда увеличение скорости обусловлено изменением природы «растворителя», окружающего субстрат в активном центре фермента, причиной этому всегда должно быть специфическое взаимодействие, использующее энергию связывания фермента с субстратом. Так, скорость реакции двух противоположно заряженных реагентов будет больше в гидрофобной среде активного центра фермента (по сравнению с реакцией в воде), поскольку в неполярном окружении заряженные реагенты дестабилизированы и в то же время дестабилизация менее заряженного переходного состояния будет не столь значительной [схема (46)].



Источником энергии, необходимой для сближения реагентов с образованием этого реакционноспособного нестабильного состояния, должна служить энергия связывания на ферменте тех групп в молекуле субстрата, которые не вступают в реакцию.

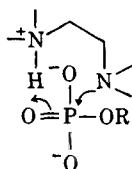
4. ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ЗАТРУДНЕНИЯ

Пространственные затруднения уменьшают, как правило, скорость нуклеофильных реакций, и поэтому нет необходимости обсуждать их здесь подробно. Нуклеофильные реакции более чувствительны к пространственным затруднениям, чем реакции общесоснового катализа. Это может служить полезным эмпирическим критерием, который позволяет практически различать эти два механизма катализа. Так, 2,6-диметилпиридин является более основными, чем пиридин, однако в нуклеофильных реакциях их реакционная способность на несколько порядков меньше. В реакциях общесоснового катализа они могут оказаться как более, так и менее реакционноспособными, чем пиридин, в зависимости от чувствительности реакции к основности и пространственным затруднениям; однако наблюдаемые различия значительно меньше, чем в случае нуклеофильных реакций [74] (см. также литературу к работам [30, 33]). Атом азота в трех- и четырехчленных циклах азиридина и азетидина менее чувствителен к стерическим условиям. Эти

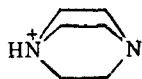
можно в значительной мере объяснить, по-видимому, то, что такие соединения обладают примерно в 100 раз большей реакционной способностью по отношению к фенилацетату, чем другие амины, обладающие сравнимой основностью [75].

5. ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Электростатические эффекты в водном растворе являются малыми и изменчивыми, поскольку вода обладает исключительной способностью сольватировать заряды. Проанализируем качественно следующие результаты. Гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты протекает лишь при продолжительном кипячении их в концентрированной щелочи, а ацильная группа дианиона ацетилфосфата значительно более стойка по отношению к атаке анионом тиола, чем другие ацильные группы. На этом основании можно полагать, что отрицательные заряды ионизированных фосфатов затрудняют атаку анионными нуклеофильными агентами [76, 49]. Монокатион тетраметилендиамина реагирует с дианионом *n*-нитрофенилфосфата с константой скорости $1,9 \cdot 10^{-5}$ л/моль · мин, которая в четыре раза больше константы скорости реакции со свободным основанием (равной $0,43 \cdot 10^{-5}$ л/моль · мин), хотя основность монокатиона (рК 5,7) в 2000 раз меньше основности свободного основания (рК 9,1) [33]. С первого взгляда эту высокую реакционную способность можно объяснить, полагая, что реакция протекает с участием внутримолекулярного общеислотного катализа протоном второго атома азота монокатиона, т. е. по согласованному бифункциональному механизму XVII.



XVII



XVIII

Однако монокатион триэтилендиамина (XVIII; рК 3,6; $k = 2,5 \cdot 10^{-5}$ л/моль · мин) также более реакционноспособен, чем можно было бы ожидать, судя по его основности, и константа скорости реакции в данном случае равна примерно значению, наблюдаемому для свободного основания (рК 8,8; $k = 6,2 \cdot 10^{-5}$ л/моль · мин), если последнее значение разделить на два, чтобы учесть, что в свободном основании имеются два реакционных атома азота. В монокатионе данного соединения исключена согласованная передача протона, как в схеме XVII, и поэтому высокие скорости реакций с участием монокатионов можно просто объяснить благоприятным электростатическим взаимодействием катионного нуклеофила с дианионным субстратом.

Такое поведение обнаруживают не все реакции, в которых возможны электростатические эффекты. Так, заряд нуклеофила не проявляет себя существенным образом в реакциях с катионом хлористого 1-(*N,N*-диметилкарбамил)-пиридиния или анионом *o*-нитрофенилоксалата, если использовать для сравнения реакции незаряженных сложных эфиров (таких, как *n*-нитрофенилацетат или *o*-нитрофениловый эфир этилоксалата) [77, 78]. С другой стороны, в случае нуклеофильных реакций анионов с ацильными группами катиона 1-ацетокси-4-метокси-пиридиния и моноаниона ацетилсалицилата было обнаружено электростатическое влияние на скорость реакции в пределах около одного порядка [79].

6. РЕЗОНАНСНАЯ СТАБИЛИЗАЦИЯ И СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕГРУППИРОВКИ

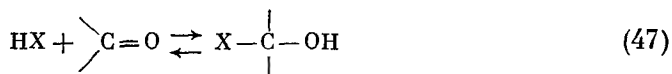
Резонансная стабилизация и структурные перегруппировки могут в различной степени стабилизировать или дестабилизировать основные состояния, переходные состояния и продукты реакции и они могут (по крайней мере теоретически) оказывать влияние на нуклеофильную реакционную способность таким же образом, как они влияют на эффективность действия общих кислотно-основных катализаторов (более подробное обсуждение дано в гл. 3 для общего кислотно-основного катализа карбоновыми кислотами). Резонансная стабилизация основной формы нуклеофила, например дианиона угольной кислоты, должна уменьшать нуклеофильную реакционную способность данного соединения, поскольку в переходном состоянии реакции резонансная стабилизация частично утрачивается. С другой стороны, резонансная стабилизация основания обуславливает также и уменьшение его основности, причем этот эффект должен быть более значительным, чем влияние на нуклеофильность, поскольку в равновесном процессе протонирования резонансное взаимодействие с реагирующими атомами утрачивается почти полностью, в то время как в переходном состоянии — лишь частично. Следовательно, при корреляциях нуклеофильности с основностью резонансная стабилизация может приводить как к положительным, так и к отрицательным отклонениям от линейной зависимости, отложенной в координатах уравнения Брэнстеда, причем характер отклонений будет зависеть от угла наклона прямой и относительного вклада резонансной стабилизации в основание, кислоту и переходное состояние.

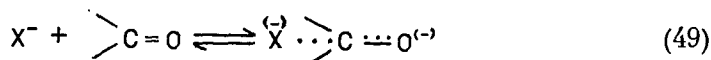
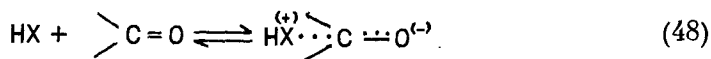
В том случае, когда образование переходного состояния требует структурной перегруппировки нуклеофила, его нуклеофильная реакционная способность может быть пониженной в соответствии с затратой свободной энергии, которая необходима для этой перегруппировки [80]. Поскольку резонансная стабилизация приводит обычно к изменениям длины связей и валентных углов, а также к изменениям гибридизации, влияние перегруппировок подобно резонансным эффектам.

Эффекты подобного рода — это удобное объяснение необычного поведения некоторых нуклеофильных реагентов. Однако слишком широкий диапазон таких интерпретаций затрудняет окончательное доказательство важности этих эффектов в механизме нуклеофильного катализа. При помощи резонансной стабилизации удалось объяснить лишь некоторые разрозненные примеры необычной реакционной способности, однако однозначные данные по систематическому изучению большого ряда нуклеофилов отсутствуют. Поэтому, по мнению автора, нельзя еще считать строго установленным, что эффекты подобного рода имеют важное значение для нуклеофильной реакционной способности.

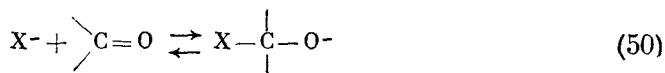
7. ПРОЧНОСТЬ СВЯЗИ С УГЛЕРОДОМ

Можно ожидать, что соединения, которые обнаруживают необычно сильное сродство к углероду в равновесных реакциях присоединения [см., например, уравнение (47)], должны обладать также и высоким сродством в переходном состоянии реакции [схемы (48) и (49)], где происходит лишь частичное образование связи с углеродом





Такие соединения должны были бы образовать необычно стабильное переходное состояние и реагировать с большой скоростью. Сравнение стабильности связи с углеродом в этих двух процессах можно проводить в двух аспектах. Сродство основных форм нуклеофила к углероду можно определить в виде «углеродной основности» [в соответствии, например, с уравнением (50)], аналогичной «водородной основности» [уравнение (51)]. Можно также сравнивать



относительное сродство нуклеофила к углероду и водороду в равновесных процессах, представленных, например, уравнением (47) [67, 81—83]. Уравнение (47) включает разрыв связи $\text{X}-\text{H}$ и π -связи в карбонильной группе и образование связей $\text{X}-\text{C}$ и $\text{O}-\text{H}$. Так как в ряду различных нуклеофилов энергии карбонильной π - и $\text{O}-\text{H}$ -связей не должны слишком различаться, то равновесие, представленное уравнением (47), отражает фактически разницу в энергиях связей $\text{X}-\text{H}$ и $\text{X}-\text{C}$. Такой подход исключает из рассмотрения вклад тех факторов, которые определяют основность по отношению к протону, и поэтому можно надеяться, что отклонения, наблюдаемые на графике зависимости нуклеофильной реакционной способности от основности, будут коррелировать с различиями в относительном сродстве к водороду и углероду, которые следуют из этого равновесия. Водородная основность действительно не оказывает почти никакого влияния на сродство к карбонильной группе, представленное в виде уравнения (47); константы равновесия, характеризующие присоединение аминов, которые имеют сравнимые пространственные затруднения, почти не зависят от их основности. Так, константы равновесия для присоединения формальдегида к простым первичным аминам (pK 10—11) лишь незначительно превышают значения, характеризующие присоединение к мочеvine и амидам (pK 0—1). Кроме того, сродство формальдегида для ряда карбоновых кислот не зависит от их кислотности в диапазоне основности 10^{11} [82, 84].

Стабильность переходного состояния коррелирует со стабильностью продуктов лишь в ограниченном числе реакций. В табл. 9 приведены константы равновесия, найденные для реакций присоединения ряда нуклеофилов к карбонильной группе пиридин-4-альдегида {значения представлены в соответствии с уравнением (47)} [85]. Характер изменения констант этих равновесий подобен изменению их в родственных реакциях, и, что самое главное, высокие значения сродства гидроксилamina, гидроперекисей и тиолов, а также большее сродство простых спиртов, чем воды, согласуются с необычно высокой реакционной способностью этих соединений (или их сопряженных оснований) по отношению к *n*-нитрофенилацетату (рис. 11). С другой стороны, гидроксамовая кислота или гидроксильная группа гидроксилaminов обладает по сравнению с простыми спиртами близким или чуть большим сродством к карбонильной группе, хотя реакционная способность этих кислородсодержащих анионов по отношению к *n*-нитрофенилацетату превышает на несколько порядков реакционную способность других кислород-

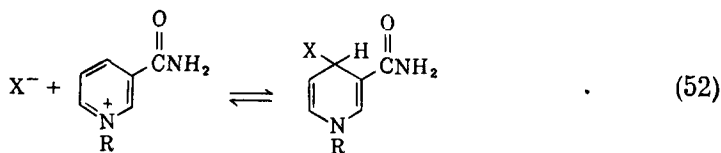
Таблица 9

Константы равновесия присоединения нуклеофилов к пиридин-4-альдегиду [85]

Нуклеофил	K, л/моль
Этиламин	43
Гидроксиламин	1500
Семикарбазид	250
Вода	0,023
Этанол	0,27
Перекись водорода	19,8
Ацетогидроксамовая кислота	0,93
N-Оксипиридин	≤ 0,34
Ацетоксим	0,80
β-Меркаптоэтанол	193

содержащих анионов, характеризующихся сравнимой основностью. Несмотря на огромное сродство цианида к карбонильной группе, он не является чрезмерно эффективным нуклеофилом [36, 54]. Если проследить достаточно большое число соединений, то, очевидно, даже эта эмпирическая корреляция не приводит к полному параллелизму с нуклеофильной реакционной способностью.

Присоединение нуклеофилов к положительно заряженному пиридиновому кольцу дифосфопиридиннуклеотида [уравнение (52)] представляет собой реакцию, подобную равновесию (50). На основании анализа значений констант равновесия этого процесса можно прийти к тем же выводам, которые были рассмотрены выше, а именно что высокоэффективные нуклеофилы, какими являются анионы тиолов, гидроксиламин и сульфит, присоединяются к пиридиновому кольцу даже в присутствии большого молярного избытка воды. Однако цианид, не будучи слишком хорошим нуклеофилом, также реагирует легко [86].

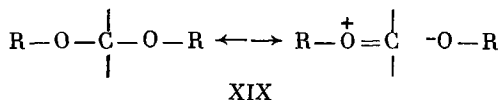


По-видимому, кривые потенциальной энергии образования и разрыва связей $\text{C} - \text{C}$ и $\text{C} - \text{N}$ имеют подобную форму, причем в обоих этих процессах стабильность переходных состояний относительно стабильности исходных состояний ниже, чем для связей углерода с более электроотрицательными элементами *. Такой характер потенциальных кривых может быть, хотя бы частично, отражением того, что $\text{C} - \text{C}$ - и $\text{C} - \text{N}$ -связи являются преимущественно ковалентными.

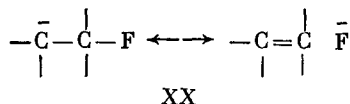
Причины, обуславливающие различия в стабильности исходного и переходного состояний в реакциях других нуклеофилов, в настоящее время

* Иными словами, высота энергетического барьера образования или разрыва $\text{C} - \text{C}$ - или $\text{C} - \text{N}$ -связи, отнесенная к свободной энергии соответствующего равновесия (например, $2\text{C} \rightleftharpoons \text{C} - \text{C}$), больше, чем то же отношение в случае разрыва, например, $\text{C} - \text{O}$ - или $\text{C} - \text{N}$ -связи. По этой причине высокое сродство цианида к карбонильной группе предполагает одновременно и высокое значение энергии активации этой реакции и, следовательно, умеренную нуклеофильность этого реагента.— *Прим. ред.*

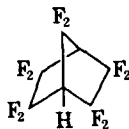
неясны. Соединения с двумя электроотрицательными атомами, связанными с углеродом, обладают особой стабильностью [87]. Увеличение электрофильного характера нуклеофила под действием соседнего электроотрицательного атома способствует усилению этого эффекта. Было высказано предположение, что данное явление обусловлено резонансом двух структур, аналогичных тем, которые были предложены для объяснения углерод-водородной гиперконъюгации. Эти структуры показаны на схеме XIX на примере ацеталей. Кстати говоря, кислотность фтор-углеродных соединений также была



объяснена подобным резонансом двух структур, представленных на схеме XX. Однако данное объяснение представляется сомнительным,



поскольку катализируемый основаниями обмен протона в соединении XXI, который может происходить лишь под влиянием полярных воздействий,



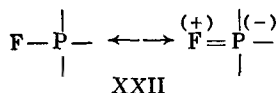
XXI

протекает даже несколько быстрее, чем в случае трис-(трифторметил)-метана. По-видимому, индукционное влияние атомов фтора достаточно большое, чтобы быть причиной кислотного характера фторированных углеводородов [88]. В связи с этим можно полагать, что особой стабильности способствуют дисперсионные взаимодействия Ван-дер-Ваальса и Лондона, возникающие между невалентными электронами заместителей.

Реакционная способность анионов галогенов по отношению к насыщенному атому углерода в воде ($\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$, см. табл. 7) ни в коей мере не отражает их сродство к насыщенному атому углерода в равновесной реакции обмена. Как видно из табл. 8, константы равновесия различаются слабо и не обнаруживают какого-либо закономерного изменения [58, 67]. Следовательно, на эти реакции оказывает важное влияние такое свойство, которое в переходном состоянии проявляется более ярко, чем в равновесии. Таким свойством является поляризуемость. Это значит, что высокорекционный нуклеофил (например, иодид) должен быть в свою очередь также и хорошей уходящей группой; опыт подтвердил это. Корреляция между реакционной способностью и равновесным сродством имеет место в том случае, если сравнивать кислоты HI , HBr и HCl . Однако наблюдаемая корреляция отражает главным образом низкую основность больших по размеру анионов, например I^- , причем нуклеофильная реакционная способность возрастает в этом ряду в обратном порядке по отношению к основности.

Ион фтора, несмотря на его низкую основность и поляризуемость, — исключительно эффективный нуклеофил по отношению к фосфатам; он один из немногих нуклеофилов, которые способны достаточно эффективно конкурировать с молекулами воды в реакции с монозамещенными фосфатами. Ион фтора обнаруживает также большую реакционную способность по отношению к диизопропилхлорфосфату, чем этилат-, фенолят- и тиофенолят-ионы [49, 89, 90]. Такая высокая реакционная способность имеет, по-видимому,

общие корни с высокой термодинамической стабильностью фторфосфатов, и не исключено, что данное явление отражает наличие резонанса между структурами, приведенными на схеме XXII [91]



В этом случае резонанс должен иметь место как в переходном состоянии, так и в продуктах реакции.

8. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ОБЩЕКИСЛОТНЫЙ КАТАЛИЗ

Некоторые нуклеофильные агенты, содержащие в определенном положении по отношению к нуклеофильному центру кислотную группу, обладают особой реакционной способностью. Это их свойство объясняют часто внутримолекулярным общекислотным катализом. В неводных растворителях именно такое содействие приводит в ряде случаев к значительному ускорению реакции (при отсутствии внутримолекулярного катализа эти реакции протекают лишь при наличии специального катализатора или при сольватации третьей молекулой). Однако в водном растворе молекулы воды, по-видимому, эффективно сольватируют молекулы субстрата за счет водородных связей еще до реакции, и поэтому известно мало систем, для которых можно показать, что кислотная группа нуклеофила действительно вытесняет молекулу воды и выполняет роль катализатора. Многие из предполагаемых механизмов подобного рода, якобы происходящих в водном растворе, не выдержали тщательной проверки. Еще большее число таких систем пока подробно не анализировали. В тех случаях, когда предполагают наличие внутримолекулярного катализа под действием протонодонорных групп (например, с участием гидроксильной группы), целесообразно изучить реакционную способность родственных соединений, в которых кислотный атом водорода замещен алкильной группой, а также соединений, у которых кислотная группа размещена в таком положении, откуда она может оказывать лишь полярное влияние как заместитель, но не может участвовать в реакции в качестве внутримолекулярного катализатора.

Ранее уже было отмечено, что повышенную реакционную способность катионов диаминов по отношению к диамиону *n*-нитрофенилфосфата можно было бы объяснить внутримолекулярным кислотным катализом, однако при изучении соединений, в которых внутримолекулярный катализ стерически невозможен, можно показать, что данное явление обусловлено электростатическим эффектом. Еще одним примером может служить быстрая реакция аниона гидроперекиси с *n*-нитрофенилацетатом в воде. В случае такого рода реакций часто предполагают внутримолекулярное содействие гидроксильной группы молекулы гидроперекиси. Однако на основании того факта, что ион метилгидроперекиси также является высокореакционным соединением (лишь не намного менее реакционным, чем сама гидроперекись), для наблюдаемой реакционной способности следует искать другое объяснение, по крайней мере для данной реакции [36, 79].

Реакция моноаниона катехина с изопропилметилфторфосфатом — одна из немногих тщательно изученных реакций, для которой были получены данные, указывающие, что ускорение реакции обусловлено внутримолекулярным общекислотным катализом (табл. 10) [92]. В реакции этого субстрата с рядом простых *мета*- и *пара*-замещенных фенолят-ионов было обнаружено 12-кратное превышение скорости над величиной, предсказанной уравнением Брэнстеда. Такое ускорение является существенным, но, конечно, не слишком большим. *n*-Окси-группа гидрохинона и *о*-метокси-группа не вызывают никакого ускорения. Возможный механизм катализа атаки фенолят-анионом включает образование водородной связи с кислородом фосфата (XXIII),

Таблица 10

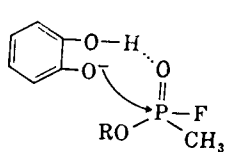
Скорости реакции замещенных фенолят-ионов
с изопропилметилфторфосфатом при 25 °C [92]

Заместитель	pK_a ^а	k_2 , л/моль · мин	Ускорение ^б
H	9,78	34	1
<i>o</i> -OH	9,60	369	12
<i>o</i> -OCH ₃	9,85	11,3	0,27
<i>n</i> -OH	10,12	77	1,3
<i>o</i> -CH ₂ NH ₃ ⁺	8,89	59	5,1
<i>m</i> -CH ₂ NH ₃ ⁺	9,06	30,2	2,1
<i>n</i> -N(CH ₃) ₃ ⁺	8,30	13,1	2,5

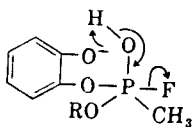
^а Исправлено с учетом статистического фактора.

^б По сравнению с ожидаемой реакционной способностью, вычисленной на основании следующего уравнения: $\log k_2 = 0,589 pK_a - 4,172$, которое справедливо для реакции с участием *мета*- и *пара*-замещенных фенолятов.

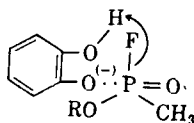
отщепление протона от продукта присоединения (XXIV) и содействие удалению иона фтора (XXV). Пятикратное ускорение, обусловленное протонированной *о*-аминометильной группой (см. табл. 10), можно было бы объяснить



XXIII



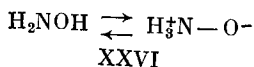
XXIV



XXV

подобным механизмом, однако ускорение реакции происходит и при наличии той же группы в *мета*-положении, а также в случае *n*-триметиламмониевой группы. Это позволяет предположить, что на самом деле ускорение реакции вызвано электростатическим эффектом. Положительный заряд в этих молекулах должен оказывать более значительное влияние на степень ионизации гидроксильной группы с образованием отрицательного заряда, чем на стабильность переходного состояния, где на фенольном атоме кислорода имеется лишь частичный отрицательный заряд. Поэтому высокую реакционную способность этих соединений следует приписать скорее аномально низкой основности, чем необычной реакционной способности.

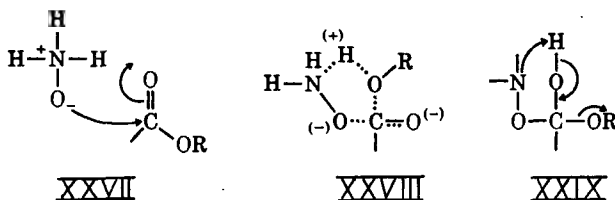
Нуклеофильность атома кислорода в молекуле гидроксиламина больше, чем атома азота в реакциях с ацетильной группой фенилацетатов [36, 93], хотя известно, что атом азота является по крайней мере в 10⁷ раз более основным. Можно почти не сомневаться в том, что эта необычная реакционная способность свидетельствует о том, что в роли нуклеофила выступает здесь кислородный анион дипольной формы гидроксиламина (XXVI),



XXVI

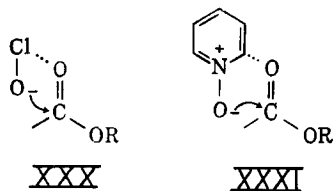
а не свободная гидроксильная группа. Тот факт, что гидроксиламин (pK 6,0) является немного более основным, чем *N*-окись триметиламина (pK 4,6), позволяет предположить, что в водном растворе гидроксиламин обычно в значительной степени существует в дипольной форме. Провести количественное сравнение, конечно, невозможно, но тем не менее можно полагать,

что суммарная реакционная способность гидроксилamina примерно в 300 раз превышает реакционную способность других аминов сравнимой основности, а реакционная способность кислородного аниона дипольной формы должна быть на несколько порядков больше, чем в случае кислородных анионов сравнимой основности. Маловероятно, чтобы этот дипольный анион обладал повышенной поляризуемостью (сам гидроксилamin характеризуется нормальной поляризуемостью); он не содержит свободной электронной пары на атоме, расположенном рядом с реагирующим атомом кислорода. Поэтому наиболее вероятным механизмом этой быстрой реакции является механизм внутримолекулярного общего кислотно-основного катализа, как это показано, например, на схемах XXVII—XXIX.



Тот факт, что алкилирование гидроксилamina протекает предпочтительнее у атома азота по сравнению с атомом кислорода, служит еще одним свидетельством того, что высокая реакционная способность атома кислорода по отношению к ацилирующим агентам обусловлена общим кислотно-основным катализом (такой катализ не играет никакой роли в реакции алкилирования).

Нет никаких причин сомневаться в том, что кислоты Льюиса могут оказывать такое же содействие реакциям нуклеофилов, как и кислоты по Брэнстеду. Вероятным объяснением высокой реакционной способности гипохлорита или N-окиси пиридина по отношению к *п*-нитрофенилацетату может служить возможное взаимодействие электронов карбонильного атома кислорода с незанятыми *d*-орбиталями атома хлора в ионе гипохлорита (XXX) или *π*-орбиталями в молекуле N-окиси пиридина (XXXI).



Известно, что такого рода донорно-акцепторные взаимодействия существуют как в растворе, так и в твердом состоянии (например, в комплексах брома и йода с ацетоном и амидами) [94, 95].

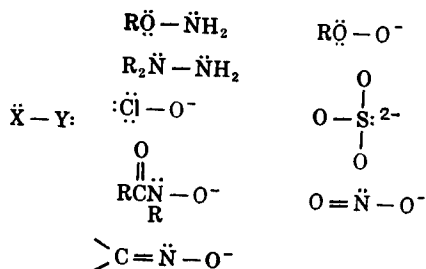
Ускорения реакции, обусловленные наличием каталитической группы в молекуле нуклеофила, в принципе не отличаются по своей природе от ускорений, обусловленных каталитическими группами в молекуле субстрата, которые обсуждались в гл. 1.

9. α-ЭФФЕКТ

Соединения, содержащие электроотрицательный атом со свободной электронной парой, расположенный рядом с нуклеофильным атомом, обнаруживают часто необычайно высокую реакционную способность, которая была названа α-эффектом [36, 96, 97]. К таким соединениям, действительно обнаруживающим высокую реакционную способность, относятся гидроксилamin и гидразин, а также анионы гипохлорита, гидроксамовых кислот,

оксидов, гидроперекисей, нитрита и сульфита. Некоторые примеры приведены на рис. 11.

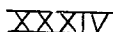
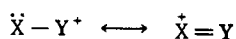
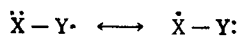
α -Эффект не имеет простой и единой природы. На нуклеофильную реакционную способность соединений влияют столько различных факторов, существующих для проявления α -эффекта, что иногда можно усомниться в полезности этого термина. Например, тот факт, что на атоме, расположенном рядом с нуклеофильным центром, почти не бывает или совсем не бывает



Соединения с α -эффектом

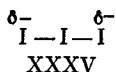
никаких заместителей, означает, что в этих соединениях практически отсутствуют стерические затруднения. С другой стороны, высокую реакционную способность аниона гидроперекиси можно приписать его высокой поляризуемости, а реакционную способность гипохлорита можно объяснить общекислотным (по Льюису) катализом атомом хлора; многие соединения, обладающие α -эффектом, обнаруживают необычайную термодинамическую стабильность по отношению к углероду, хотя другие этим свойством не обладают [36, 81, 85, 98]. Тем не менее часто полезно использовать собирательный термин, который описывает эффекты, до конца не понятые. Кроме того, нет, по-видимому, сомнений, что электроотрицательный атом со свободной электронной парой, расположенный в α -положении, непосредственно усиливает нуклеофильность некоторых, если не всех, подобных соединений.

Наиболее часто предполагают, что эта электронная пара служит причиной возрастания эффективной электронной плотности на реакционном центре, что способствует увеличению нуклеофильности. Если из атома Y удалить один или два электрона с образованием радикала или ониевого иона, то возникшая частица с пониженной электронной плотностью будет сильно стабилизироваться при резонансе в результате перехода электронов от свободной электронной пары на атоме X. В таком случае можно полагать, что частичное удаление электронов от Y при передаче их субстрату в переходном состоянии реакции аналогично процессу, в результате которого на Y возникает недостаток электронов. В свою очередь этот дефицит электронов можно компенсировать подачей электронов от X таким же образом, как в случае радикалов или ониевых ионов XXXII—XXXIV



В итоге произойдет увеличение эффективной электронной плотности на субстрате и, следовательно, увеличится нуклеофильность соединения $X - Y$ [97].

Данное предположение содержит явное затруднение, которое заключается в том, что в этом механизме должен принимать участие атом Y с большим числом связей и электронов, чем это возможно без увеличения его обычной валентности. Тот факт, что атомом Y могут быть элементы первого ряда периодической таблицы, означает, что какое-либо расширение валентной оболочки, которое существенным образом затрагивало бы d -орбитали, является маловероятным. Однако в такой системе нет чрезмерно большого числа электронов по сравнению с общим числом свободных атомных орбиталей, и поэтому если p -орбитали каждого из участвующих атомов претерпевают гибридизацию с образованием молекулярных орбиталей, относящихся ко всей системе, то можно получить стабильную систему даже без использования d -орбиталей. Тот же тип гибридизации был предложен для объяснения ковалентного характера водородной связи переходного состояния простого S_N2 -замещения при атоме углерода и механизма образования полиагеновых комплексов типа $I - I - I^-$, не привлекая орбитали с высокой энергией, хотя в каждом из этих случаев необходимо допустить связывание центрального атома с большим числом атомов, чем обычно [99, 100]. В этих системах средний атом связан с двумя внешними атомами одинарной связью с двумя электронами. Еще одна электронная пара находится на несвязывающей орбитали, которая охватывает лишь оба внешних атома. Последнее приводит к образованию на этих атомах высокой плотности заряда, подобно тому, как показано на схеме XXXV для иона трииодида. Такая

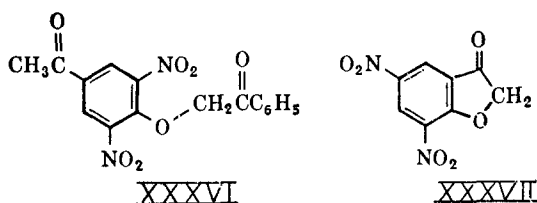


структура благоприятна для нуклеофильных реакций, так как высокая плотность заряда на молекуле субстрата способствует удалению уходящей группы. Более того, можно полагать, что молекула перекиси водорода даже в исходном состоянии представляет собой систему, состоящую из двух атомов кислорода, связанных кратной связью, близкой к связи в молекуле кислорода, причем к каждому из обоих неспаренных электронов, которые находятся на несвязывающих орбиталях молекулы кислорода, присоединен атом водорода [101]. Эта модель на современном уровне описывает раннее предположение, что связь между атомами кислорода в молекуле перекиси водорода имеет кратный характер. Данное предположение впервые в 1895 г. было выдвинуто Брюлом для объяснения исключительно высокой поляризуемости и молярной рефракции перекиси водорода [102]. Приведенные примеры позволяют предположить, что допускаемое в конечном итоге высокое координационное число нуклеофильного атома в соединениях с α -эффектом вовсе не исключает энергетически благоприятного участия в переходном состоянии электронной пары соседнего атома. Наличие дополнительных орбиталей в ненасыщенных субстратах может облегчить образование стабильных молекулярных орбиталей в переходном состоянии. В связи с этим интересно отметить, что α -эффект наблюдали чаще всего именно в реакциях ненасыщенных субстратов [103]. К сожалению, в литературе отсутствует количественное рассмотрение этого типа взаимодействия. С другой стороны, нельзя забывать, что свободная пара электронов, находящаяся на α -атоме, непосредственно взаимодействует с субстратом, или можно полагать, что α -эффект вообще не связан со свободной парой электронов, а на самом деле является следствием электроотрицательности α -атома.

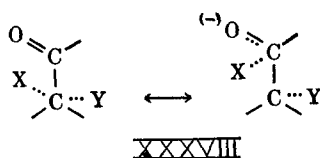
Следует отметить, что, если исходные реагенты дестабилизированы, например вследствие неблагоприятной сольватации или в результате энергетически неблагоприятного взаимодействия электронных пар на соседних

атомах, их нуклеофильная реакционная способность должна возрасти, если степень их дестабилизации уменьшается в переходном состоянии. Однако в этом случае в целом должно произойти также и увеличение основности, и поэтому, исходя из такого механизма, вряд ли можно объяснить увеличение нуклеофильной реакционной способности по отношению к основности.

Не исключено, что ускорения реакций, которые были обнаружены при атаке нуклеофилами насыщенного атома углерода, расположенного рядом с карбонильной группой, обусловлены взаимодействием подобного рода. В качестве объяснения высоких скоростей реакций замещения α -галогензамещенных кетонов было выдвинуто представление о некотором перекрывании орбитали атакующей электронной пары с орбиталями π -электронов карбонильной группы, что понижает энергию переходного состояния [104]. Замещение динитрофенольной группы в XXXVI при 0°C протекает в 9000 раз быстрее, чем в соединении XXXVII, где такое взаимодействие с карбонильной группой при атаке нуклеофилом исключено [105].



Взаимодействие этого типа не может непосредственно увеличить электронную плотность на реакционном центре, однако оно может частично стабилизировать переходное состояние за счет дополнительного перекрывания электронных орбиталей (XXXVIII). Это представление подобно тому объяснению α -эффекта, которое постулирует, что стабилизация переходного состоя-

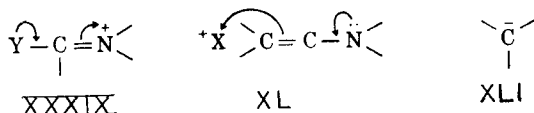


ния происходит за счет использования электронов и орбиталей, принадлежащих соседним атомам, которые, как можно ожидать, не участвуют в связывании в классическом понимании валентной связи.

Д. ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ

Важнейшая роль катализатора в электрофильном ковалентном катализе — облегчение протекания реакции и содействие удалению электронов из реакционного центра. Между электрофильным и нуклеофильным катализом нет резкой границы, поскольку реакции электрофильного катализа часто предшествует стадия, в которой катализатор, чтобы присоединиться к субстрату, действует как нуклеофил [см. уравнения (27) и (28)]. Более того, электрофильный катализ какой-либо реакции соответствует обычно нуклеофильному катализу обратной реакции. Поэтому используемое совершенно произвольное разграничение этих механизмов основано на том, представляет ли собой стадия, которая является наиболее важной для катализа, нуклеофильную или электрофильную атаку, способствующую протеканию реакции в том направлении, в котором ее обычно записывают.

Электрофильными катализаторами могут служить протоны, поступающие из растворителя или от обобщенной кислоты, ионы металла, а также органические молекулы, содержащие группы, способные принимать электроны. Катализ протоном в ферментативных реакциях протекает обычно по механизму обобщекислотного катализа, и его обсуждение приведено в гл. 3. Катализ ионами металлов здесь обсуждаться подробно не будет. Наиболее важный простой механизм ковалентного электрофильного катализа в ферментативных реакциях заключается в том, что присоединение субстрата к катализатору дает соединение, в котором атом азота с положительным зарядом действует как ловушка электронов, или незаряженный азот выступает в качестве донора электронной пары, как это происходит в реакциях с участием енаминов (XXXIX, XL). Несмотря на то что сам азот не обладает



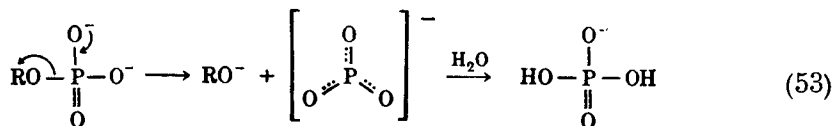
большой электроотрицательностью, тем не менее в таких реакциях он может действовать как эффективная ловушка электронов благодаря тому, что он легко протонируется и легко образует катионные ненасыщенные продукты присоединения. Легкость образования этих заряженных соединений настолько перекрывает низкую электроотрицательность азота, и поэтому азот действует как ловушка электронов более эффективно, чем кислород, который хотя и более электроотрицателен, но образует при нейтральных значениях pH катион настолько трудно, что в таком механизме реакции он фактически неактивен как акцептор электрона. Наоборот, легкость, с которой азот может отдавать электронную пару, позволяет ему действовать как своего рода малоактивный карбанион; енамин легко может отдавать электроны с образованием новой связи к углеродному атому (XL), в то время как образование истинного карбаниона (XLI) — это процесс, характеризующийся значительно более высокой энергией.

1. АТФ И МЕТАЛЛЫ

Катализ реакции переноса фосфата от АТФ (аденозинтрифосфат) к воде или к другим акцепторам — это интересный пример электрофильного катализа металлами [106]. Ион металла в реакциях такого рода может вести себя по-разному: 1) экранировать (гасить) отрицательные заряды на фосфатной группе, которые в противном случае стремились бы препятствовать атаке электронной пары нуклеофила, особенно в случае анионного нуклеофила; 2) увеличивать реакционную способность атакуемого атома, оттягивая на себя электроны; 3) способствовать улучшению свойств уходящей группы; 4) служить связующим звеном между нуклеофилом и субстратом; 5) изменять pK и реакционную способность нуклеофила; 6) изменять, по-видимому, геометрию молекулы субстрата таким образом, чтобы облегчить протекание реакции. Катализ ионами металлов является важным для многих ферментативных процессов и включает, по-видимому, эти же факторы. Кроме того, ион металла может участвовать и в связывании субстрата на ферменте в правильном положении. Применение методов ЭПР и ЯМР к исследованию непосредственного окружения иона металла позволило различить эти возможные механизмы как в ферментативных, так и неферментативных реакциях [107, 108].

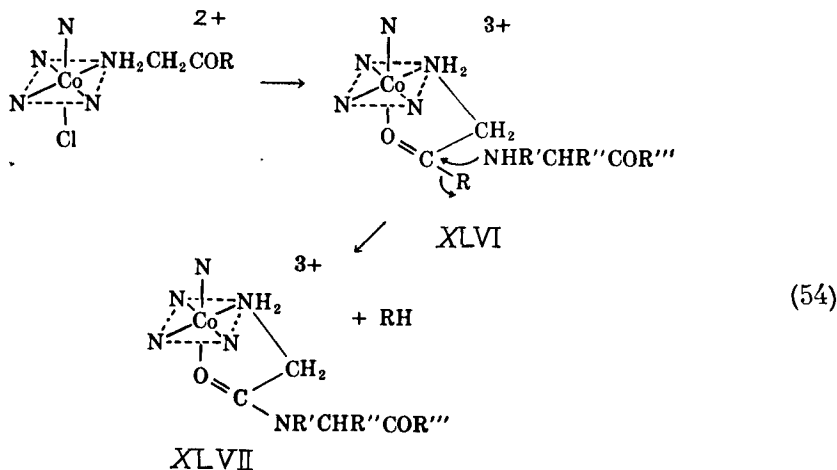
Активация АТФ под действием металлов представляет особый интерес, так как в результате становится возможным как гидролиз, так и неферментативное фосфорилирование анионных акцепторов, таких, как фосфат (с обра-

реакции гидролиза и переноса фосфатной группы с участием γ -фенилпропилтрифосфата и АТФ, однако скорости этих процессов почти не различаются. Это указывает, что при катализе более жесткими металлами взаимодействие с циклом не существенно для реакции [109]. Комплексы металл-АТФ могут иметь разное строение (XLII—XLV), причем следует учесть, что те комплексы, которые преобладают в растворе, не обязательно должны быть реакционноспособными и, кроме того, разные структуры могут оказаться наиболее реакционноспособными в разных реакциях, протекающих по разным механизмам. Связывание иона металла с концевой фосфатной группой (как это показано на схемах XLII, XLIV и XLV) способствует нуклеофильной атаке, направленной именно на эту группу. С другой стороны, отщеплению уходящей группы должно в наибольшей степени благоприятствовать образование структуры, где металл связан с внутренними фосфатными группами, как это показано на схемах XLIII и XLIV. Значительное число данных указывает на то, что при гидролизе монозамещенных фосфатов в качестве начального продукта отщепляется моноион метафосфата, который затем быстро гидратируется с образованием неорганического фосфата {уравнение (53)} [110]. Такому механизму реакции должно способствовать связывание



иона металла с внутренними фосфатными группами (XLIII), в то время как связывание металла с концевой фосфатной группой АТФ (XLII и XLV) должно тормозить реакцию. В случае ферментативных реакций вклад фермента в ускорение реакции и в ее специфичность может заключаться просто в том, что фермент обеспечивает связывание металла с АТФ в виде структуры, наиболее благоприятной для данной катализируемой реакции.

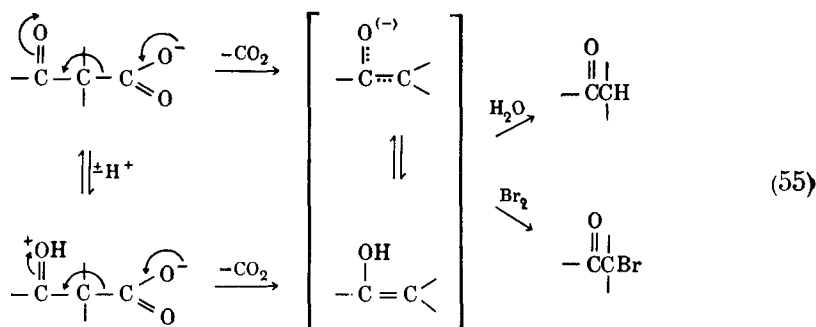
Катализ ионами металлов особенно распространен в реакциях гидролиза и переноса с участием ацилпроизводных, где происходит, по-видимому, активация карбонильной группы по отношению к нуклеофильной атаке и связывание металла с уходящей группой, облегчающее ее отщепление. Первый тип активации получил прямое подтверждение на примере реакций комплексов Co(III) , которые очень медленно обменивают лиганды [111]. Группа $\text{Co(триэтиленetetрамин)}^{3+}$, которая катализирует быструю реакцию конденсации двух молей этилового эфира глицина с образованием этилового эфира глицилглицина, выступает в роли как активирующей, так и защитной группы. Продуктом реакции является соединение глицилглицина XLVII,



в котором как амино-, так и карбонильная группы связаны с кобальтом. Соединение XLVI, в котором происходит активация карбонильной группы при ее взаимодействии с металлом, реагирует с этиловым эфиром глицина, давая менее чем за 1 мин при 20 °С соединение XLVII. На основании этих результатов можно полагать, что последовательность реакций схемы (54) объясняет механизм катализа не только этого, но и родственных процессов.

2. ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ β -КЕТОКИСЛОТ

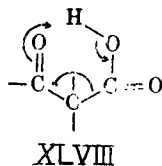
Механизм реакции декарбоксилирования требует наличия в молекуле субстрата электрофильного центра, способного принять электронную пару, поставляемую карбоксильной группой (в анионной форме), что должно приводить к образованию карбаниона или соединения, подобного ему. В случае β -кетокислот (например, в ацетоацетате) роль электрофильного центра может выполнять β -карбонильная группа, которая действует как ловушка электронов и образует в качестве продукта анион енолята [схема (55)]. Протеканию



реакции способствует протонирование карбонильной группы, которая становится при этом более эффективной ловушкой электронов, образуя в качестве продукта свободный енол, несмотря на то что этот реакционный путь характеризуется высоким энергетическим барьером вследствие низкой основности карбонильной группы. Переходное состояние реакции, протекающей по механизму кислотного катализа, не содержит суммарного заряда, и поэтому наблюдаемая скорость реакции должна быть в соответствии с этим механизмом пропорциональна концентрации незаряженной ацетоуксусной кислоты [уравнение (56)]. Слабая зависимость скорости реакции от полярности

$$v = k \left[\begin{array}{c} \text{HO}^+ \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{C}\text{C}\text{COO}^- \\ | \end{array} \right] = k' \left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{C}\text{C}\text{COOH} \\ | \end{array} \right] \quad (56)$$

растворителя соответствует представлению о согласованном механизме, в котором протон для карбонильной группы предоставляет карбоксильная группа (XLVIII) [112]



Следует, однако, обратить внимание на то, что обнаруживаемое на опыте слабое влияние растворителя отражает только лишь *разницу* в полярности исходного и переходного состояний. Поэтому тот факт, что влияние растворителя оказывается слабым, сам по себе не исключает возможность образования промежуточного диттер-иона, а свидетельствует лишь о том, что исходное и переходное состояния реакции обладают близкой полярностью. Значительный дейтериевый изотопный эффект, наблюдаемый в случае неко-

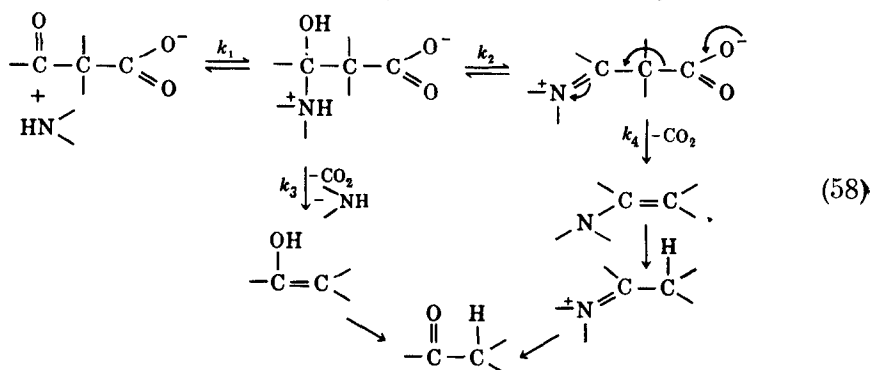
торых β -кетокислот, указывает на справедливость согласованного механизма катализа. Однако величина изотопного эффекта зависит от природы исследуемых соединений и растворителя, и, кроме того, следует ожидать, что константы равновесия при образовании дипольного промежуточного соединения также могут обнаруживать заметный изотопный эффект [113].

Наиболее подробно изучен механизм превращения α , α -диметилацетуксусной кислоты, так как в этой реакции нет осложнений, связанных с енолизацией исходного реагента. Скорость декарбоксилирования этого соединения в присутствии брома равна скорости образования бромированного кетона, причем скорость не зависит от концентрации брома. Это свидетельствует о том, что промежуточный енольный продукт можно улавливать при помощи быстрой реакции с бромом {схема (55)} [114].

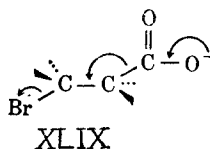
Амины оказывают каталитическое влияние на декарбоксилирование α , α -диметилацетата; эффективность их действия уменьшается в последовательности: первичные > вторичные > третичные. Несмотря на то что выражение для скорости реакций, катализируемых анилином и *o*-хлоранилином, содержит несколько членов (причем некоторые из них не получили до сих пор достаточного объяснения), зависимость обеих реакций от pH имеет максимум, наличие которого связано лишь с членом, в который входят концентрации свободного амина, карбоксилат-аниона и ионов водорода [уравнение (57)].

$$v = k[\text{RNH}_2] \left[\text{—} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{—} \text{C} \text{—} \text{C} \text{—} \text{COO}^- \right] [\text{H}^+] = k' \left[\text{—} \overset{\text{R}\overset{+}{\text{N}}\text{H}}{\parallel} \text{—} \text{C} \text{—} \text{C} \text{—} \text{COO}^- \right] \quad (57)$$

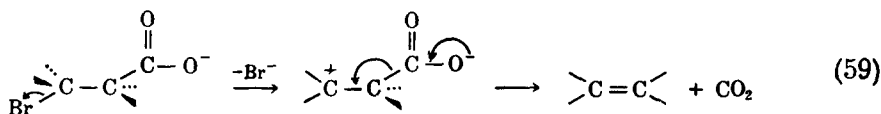
Эту зависимость можно разумно объяснить на основании механизма, который состоит из следующих стадий: образования основания Шиффа из амина и β -карбонильной группы, протонирования относительно основного атома азота в основании Шиффа (в результате чего образуется эффективная ловушка электронов) и декарбоксилирования {схема (58), k_2 и k_4 } [114].



Альтернативный механизм предусматривает декарбоксилирование уже на стадии образования протонированного карбиноламина (продукта присоединения), которое происходит с одновременным отщеплением амина [схема (58), k_3]. Некоторые кинетические данные позволяют отдать предпочтение второму механизму в случае катализированного анилином декарбоксилирования оксалоацетата в воде [115]; сходный механизм наблюдается при декарбоксилировании дибромидов коричной кислоты в неводных растворителях, которое протекает как согласованное *транс*-отщепление (XLIX) [116]

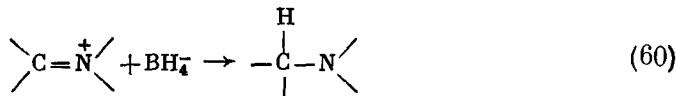


Однако механизм реакции, по-видимому, может меняться при изменении условий и для разных субстратов. Превращение дибромиды коричной кислоты в воде протекает в значительной степени постадийно по механизму с участием иона карбония, поскольку эта среда благоприятствует ионному механизму {схема (59)} [116].



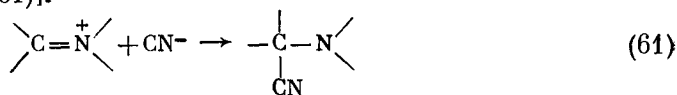
Декарбоксилирование щавелевоуксусной кислоты в этаноле в присутствии амина протекает с той же скоростью, что и образование основания Шиффа из этилового эфира этой кислоты [115]; кроме того, скорость катализируемого цианометиламином декарбоксилирования ацетоацетата в водном растворе совпадает со скоростью реакции этилового эфира ацетоуксусной кислоты с цианометиламином с образованием основания Шиффа и енамина [117]. Если, как это кажется вероятным, стадией, лимитирующей скорость этих реакций, считать дегидратирование промежуточного карбиноламина [уравнение (58), k_2], то равенство скоростей декарбоксилирования исходной кислоты и образования продукта присоединения в случае эфиров указывает на то, что скорость определяющей стадией этих реакций декарбоксилирования является образование основания Шиффа. Третичные амины также должны были бы реагировать по механизму согласованного декарбоксилирования карбиноламина — продукта присоединения; поэтому отсутствие каталитической активности третичных аминов (при условии, что можно исключить стерические факторы) служит еще одним доводом, опровергающим наличие сопряженного механизма в рассматриваемых случаях.

Были получены убедительные данные, подтверждающие, что реакция ферментативного декарбоксилирования ацетоацетата протекает через промежуточное образование основания Шиффа по механизму, который имеет много общего с механизмом неферментативной реакции, катализируемой аминами {схема (58)} [118]. В присутствии субстрата в результате восстановления боргидридом происходит необратимое ингибирование фермента, по-видимому, вследствие того, что промежуточное основание Шиффа восстанавливается до неререакционноспособного амина [схема (60)]. Из продуктов гидролиза инактивированного фермента можно выделить N-изопропилпроизводное лизина

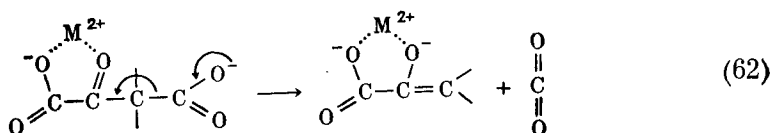


Это значит, что восстановлению подвергается основание Шиффа (или енамин), которое возникло из остатка ацетона и ε -амино-группы остатка лизина, относящегося к ферменту; стадия декарбоксилирования протекает, очевидно, быстро и заканчивается до восстановления. Если пометить ацетоацетат в карбонильной группе тяжелым кислородом, то оказывается, что ацетон—продукт ферментативной реакции не содержит ^{18}O . Этот результат доказывает, что меченый атом кислорода не содержится уже в промежуточном соединении, как и следовало ожидать, если реакция протекает по механизму с образованием основания Шиффа. С другой стороны, эти данные противостоят альтернативному механизму реакции, который заключается в согласованном отщеплении амина из промежуточного карбиноламина [схема (58), k_3] и не должен приводить к потере атома кислорода. И наконец, в присутствии субстрата фермент теряет активность под действием цианида, который присоединяется к основанию Шиффа с образованием стабильного продукта

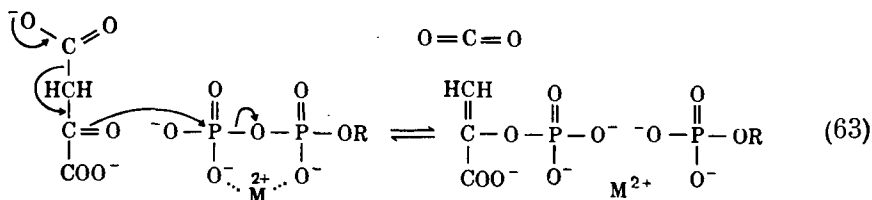
присоединения [схема (61)].



На декарбоксилирование диметил оксалоацетата оказывают каталитическое действие ионы металлов, например Al^{3+} и Cu^{2+} , которые могут образовать комплекс с анионом карбоксильной группы и кетонной группой, и действуют как ловушка электронов при декарбоксилировании; эти металлы могут также стабилизировать образовавшийся енолятный ион [схема (62)] [119].

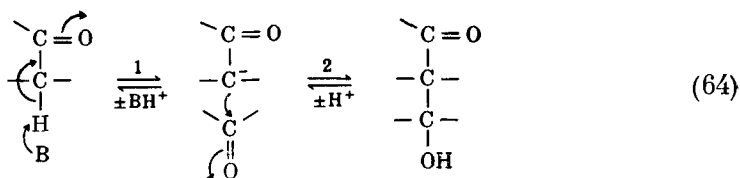


В случае моноэтилового эфира или в случае ацетоацетата такой механизм катализа не реализуется, поскольку эти соединения не могут образовать такой хелатный комплекс. Большинство ферментов, которые катализируют декарбоксилирование оксалоацетата, для проявления каталитической активности нуждается в ионах металлов. Поэтому можно полагать, что рассмотренная реакция до известной степени моделирует ферментативный процесс. Механизм других ферментативных реакций декарбоксилирования оксалоацетата, протекающих в отсутствие прямого взаимодействия этого субстрата с металлом, включает подачу электронов на электрофильный центр, которым в данном случае является энергетически богатая пиррофосфатная связь пиррофосфата или нуклеозидтрифосфата, связанного с ионом металла; в результате образуется фосфоенольная форма пировиноградной кислоты [схема (63)]



3. АЛЬДОЛЬНАЯ КОНДЕНСАЦИЯ

В альдольную конденсацию входят две существенно затрудненные стадии, на которые и должно быть направлено действие катализатора, чтобы увеличить скорость реакции. Они заключаются в следующем. Во-первых, активированный атом углерода, который должен атаковать карбонильную группу, вначале должен потерять протон с образованием енолят-иона (или эквивалентного ему соединения), и, во-вторых, енол (или енолят) должен образовать новую углерод-углеродную связь с карбонильной группой акцептора [схема (64)].

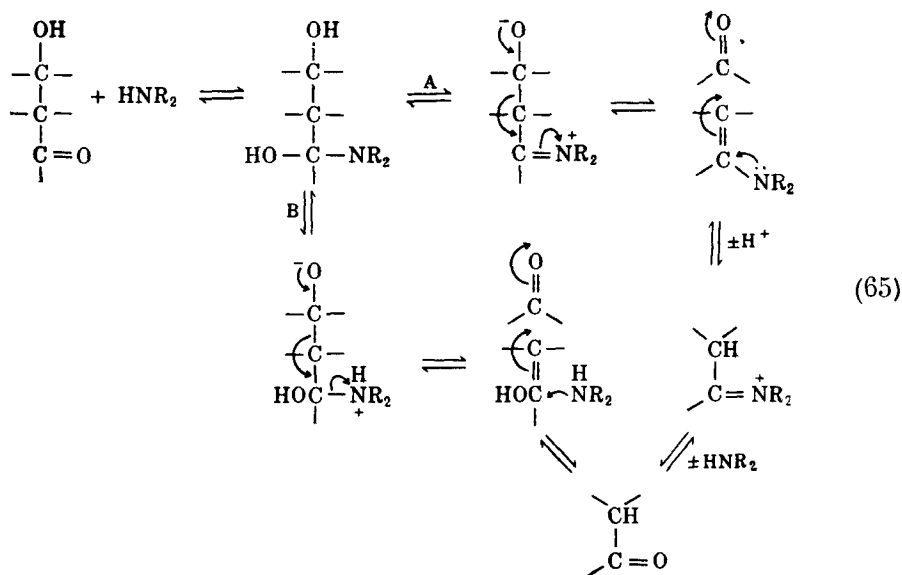


Поскольку кинетический порядок по карбонильному соединению у этих стадий различен (первый и второй), то в зависимости от условий любая

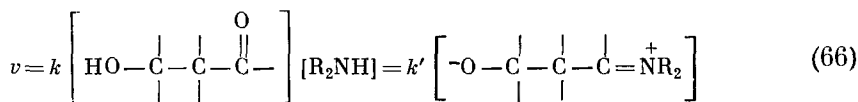
из этих стадий может определять скорость реакции. Действительно, в реакции самоконденсации ацетальдегида, протекающей при высокой концентрации ацетальдегида и низкой концентрации основания, скорость процесса определяется скоростью енолизации, и, наоборот, при низкой концентрации ацетальдегида и высокой концентрации основания стадией, лимитирующей скорость реакции, становится конденсация [120].

Ферментативный катализ альдольной конденсации также можно условно разделить на составляющие стадии. Нативная альдолаза катализирует стереоспецифическое отщепление протона от фосфата диоксиацетона, причем было найдено, что скорость этой реакции, измеренная по обмену трития с растворителем, намного выше, чем общая скорость реакции, катализируемой альдолазой. Иными словами, скорость реакции определяет преимущественно стадия конденсации [схема (64)]. Если фермент модифицировать действием карбоксипептидазы, то происходит специфическое уменьшение ферментативной активности на стадии отщепления протона и скорость определяющим процессом становится именно эта стадия. Обмен трития при этом становится незначительным, а при использовании диоксиацетона, содержащего дейтерий в положении, где идет отщепление протона, скорость общей реакции начинает зависеть от дейтериевого изотопного эффекта. С этим же модифицированным ферментом наблюдается быстрая реакция обмена карбонильного компонента реакции глицеральдегид-3-фосфата на гексозодифосфат {схема (64), стадия 2, быстрая} [121].

Эффективность аминов в качестве катализаторов реакции деальдолизации диацетонового спирта [которая представляет собой реакцию, обратную альдольной конденсации, протекающей по схеме (64)] соответствует ряду первичные > вторичные > третичные амины [122] и аналогична последовательности для реакции декарбоксилирования, катализируемой аминами. Характер pH-зависимости этой реакции указывает на то, что скорость реакции пропорциональна концентрации свободного амина и свободного диацетонового спирта, т. е. можно полагать, что суммарный заряд переходного состояния, возникшего из диацетонового спирта и амина, равен нулю. Поскольку скорость определяющей стадией в реакции, протекающей в разбавленном растворе, является скорее всего расщепление связи углерод — углерод, то можно считать, что каталитическая реакция протекает по механизму, представленному схемой (65), путь А. В соответствии с этим механизмом



первичные и вторичные амины реагируют с карбонильной группой субстрата с образованием катионного основания Шиффа, азот которого принимает электроны от депротонизованной спиртовой группы, что способствует реакции расщепления. В соответствии с этим механизмом переходное состояние реакции не имеет суммарного заряда, как этого и требует наблюдаемая на опыте рН-зависимость реакции [уравнение (66)]

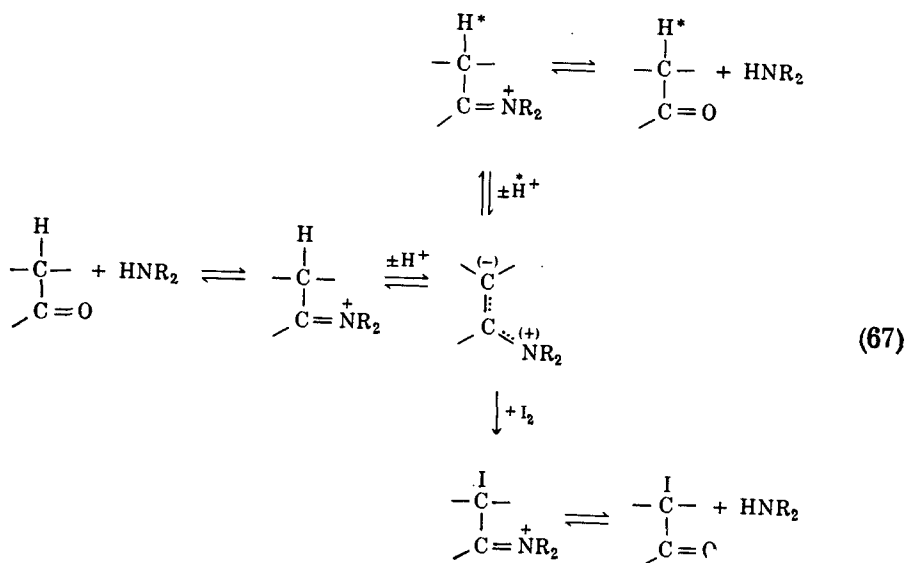


На протекание реакции не оказывает заметного влияния природа растворителя, что подтверждает приведенный механизм, так как это свидетельствует о сходстве полярности переходного состояния и полярности исходных реагентов. Нельзя, однако, исключить наличие в реакции дипольного промежуточного соединения. Так же, как и в случае катализируемой аминами реакции декарбоксилирования, возможно, что реакция протекает через превращение карбиноламина по механизму согласованного отщепления протонированного амина {схема (65), путь Б} [123]. Однако третичные амины и здесь не обнаруживают каталитической активности, что противоречит данному механизму реакции (если только отсутствие каталитической активности не вызвано стерическими причинами). При протекании реакции в обратном направлении этот механизм и аналогичный механизм катализируемого аминами декарбоксилирования потребовали бы наличия сопряженной тримолекулярной атаки амина на енол и енола на $\text{C}=\text{O}$ -группу.

Катализируемая аминами альдольная конденсация протекает, по-видимому, по такому же механизму, как и реакция деальдолизации, только в обратном направлении [124]. В направлении реакции конденсации катализатор способствует образованию енамина, который по существу представляет собой легко возникающий карбанион, так как электронная пара атома азота служит движущей силой атаки карбонильной группы. В результате образуется новая углерод-углеродная связь [уравнение (65), путь А, обратная реакция]. Детальный механизм этой реакции еще не ясен; не исключено, например, что при некоторых условиях скорость определяющей стадией может стать одна из стадий образования основания Шиффа.

Другой важной стадией в реакции альдольной конденсации, а также в большинстве реакций карбоксилирование — декарбоксилирование является перенос протона, в котором принимает участие атом углерода, реагирующий в виде карбаниона или в форме, подобной карбаниону. Перенос протона, направленный к этому атому углерода или от него, происходит обычно путем кето-енольной таутомеризации [схема (64), стадия 1], но при содействии аминов он может идти по энергетически более выгодному пути имин-енаминной таутомеризации [схема (67)]. За этой стадией, катализируемой аминами, можно удобно следить, измеряя скорость обмена дейтерия или трития или же скорость иодирования образующихся енола или енамина. Катализируемая аминами енолизация ацетона и изомалянового альдегида протекает по обычному пути общесосновного катализа отщепления протона от карбонильных соединений; однако в случае первичных и вторичных аминов и аммиака идет также быстрая каталитическая реакция, скорость которой пропорциональна концентрации протонированного амина и которая протекает по крайней мере в 10^6 раз быстрее, чем реакция, катализируемая карбоновыми кислотами сравнимой кислотности [125]. Тот факт, что скорость реакции пропорциональна концентрациям карбонильного соединения и протонированного амина, означает, что переходное

состояние реакции положительно заряжено. В этом случае механизм реакции можно представить в виде схемы (67), в соответствии с которой скорость реакции запишется в виде уравнения (68). На справедливость

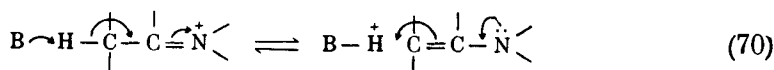


этого механизма указывают также

$$v = k \left[\text{H}-\overset{\text{O}}{\underset{|}{\text{C}}}-\overset{|}{\text{C}}- \right] [\text{H}_2\text{NR}_2^+] = k' \left[\text{H}-\overset{|}{\text{C}}-\overset{|}{\text{C}}=\text{NR}_2^+ \right] \quad (68)$$

следующие факты. При некоторых благоприятных условиях можно непосредственно наблюдать накопление промежуточного имина. Катализируемая реакция может быть дополнительно ускорена путем использования обычных общесловесных катализаторов, поскольку выражение для скорости процесса содержит член, в который входят концентрации основания и катиона имина, как это показано в уравнении (69). Этот член явно отражает общесловесной катализ стадии отщепления протона от промежуточного катионного основания Шиффа с образованием енамина [схема (70)]

$$v = k \left[\text{H}-\overset{|}{\text{C}}-\overset{|}{\text{C}}=\text{N}^+ \right] [\text{B}] \quad (69)$$

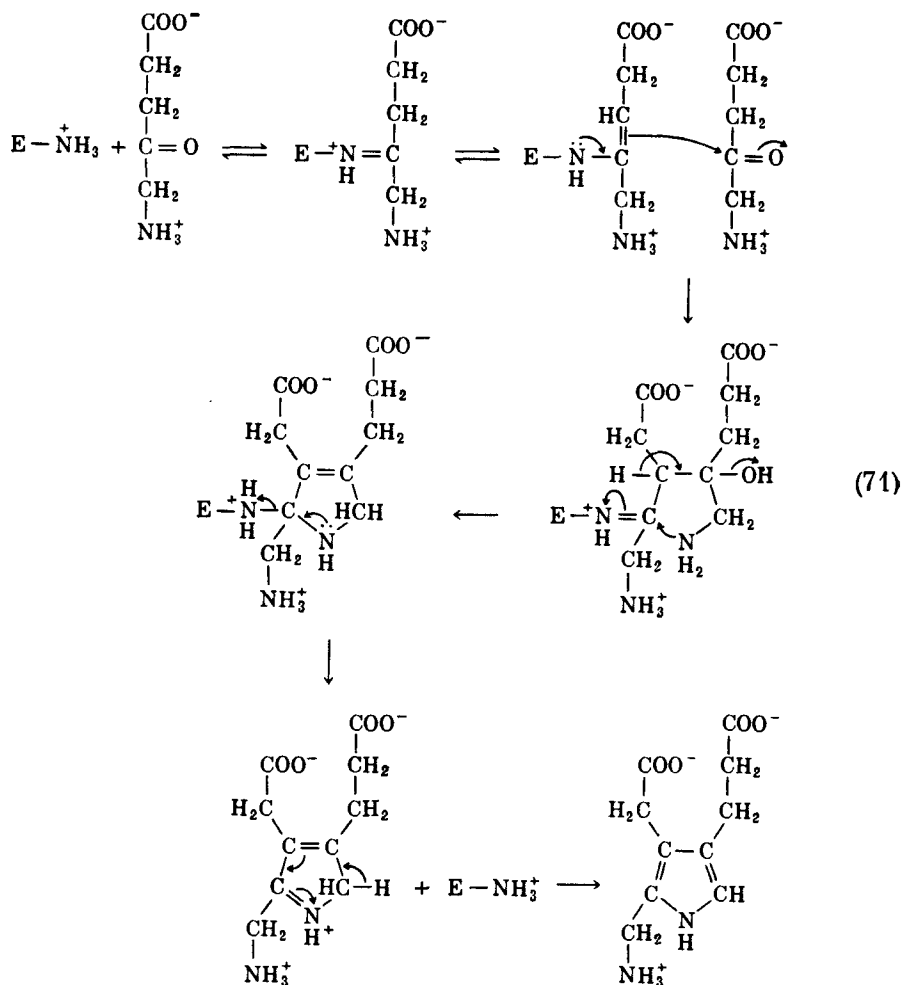


С учетом этого выражение для скорости реакции, записанное в виде уравнения (68), представляет собой лишь частный случай уравнения (69), где основание В — вода. В реакции, записанной в виде схемы (67), катион имина действует как ловушка электронов, облегчая отщепление протона, т. е. он ведет себя так же, как и при отщеплении двуокиси углерода или карбонильного соединения в реакциях декарбоксилирования и деальдользации соответственно.

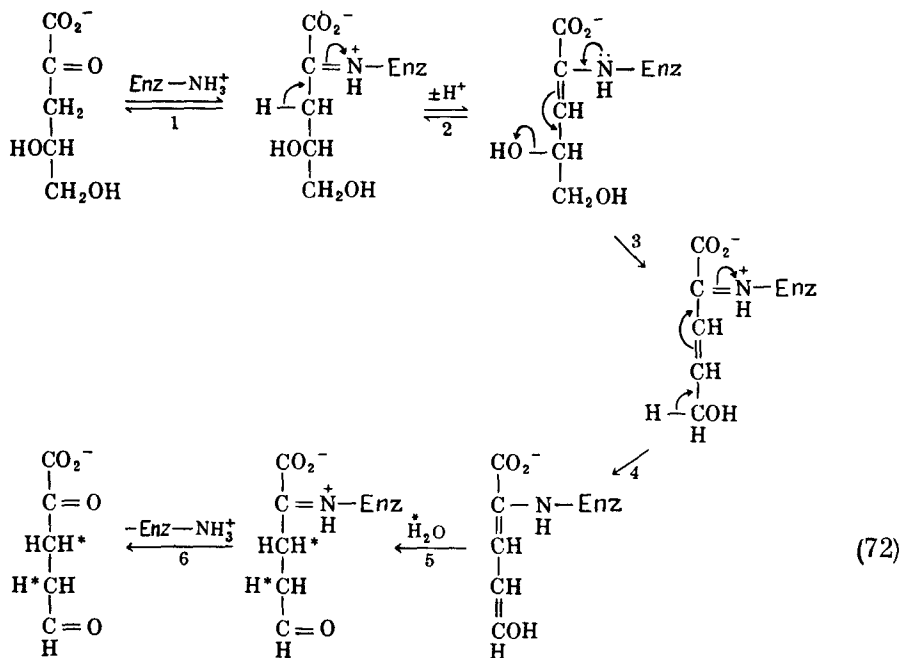
Имеются веские доводы, утверждающие, что этот же тип катализа аминами наблюдается в некоторых ферментативных реакциях альдольной конденсации [126, 127]. Восстановление фермента боргидридом в присут-

ствии кетона, участвующего в реакции енолизации, вызывает необратимую инактивацию фермента. При этом из кетона и лизинового остатка фермента образуется стабильный вторичный амин, по-видимому в результате восстановления промежуточного имина [схема (60)] или енамина, аналогично тому, как это происходит в случае ацетоеацетатдекарбоксилазы. Альдолазу можно также ингибировать цианидом в присутствии диоксиацетонфосфата, по-видимому, за счет присоединения цианида к промежуточному имину [схема (61)] [128]. И наконец, при расщеплении 2-кето-3-дезоксиглюконата под действием его специфической альдолазы происходит обмен атома кислорода кетонной группы на кислород растворителя, как этого и следует ожидать, если в качестве промежуточного соединения образуется имин [129].

Синтез замещенного пиррола из двух молекул δ -аминолевулиновой кислоты протекает, по-видимому, через промежуточное образование основания Шиффа из одной молекулы субстрата и фермента (кстати говоря, это промежуточное соединение также можно улавливать, восстанавливая его боргидридом). Затем промежуточный енамин атакует карбонильную группу второй молекулы субстрата, после чего происходит дегидратация продукта присоединения и, наконец, *транс*-иминирование («*транс*-шиффизация») и депротонирование с образованием пиррола [схема (71)] [130].



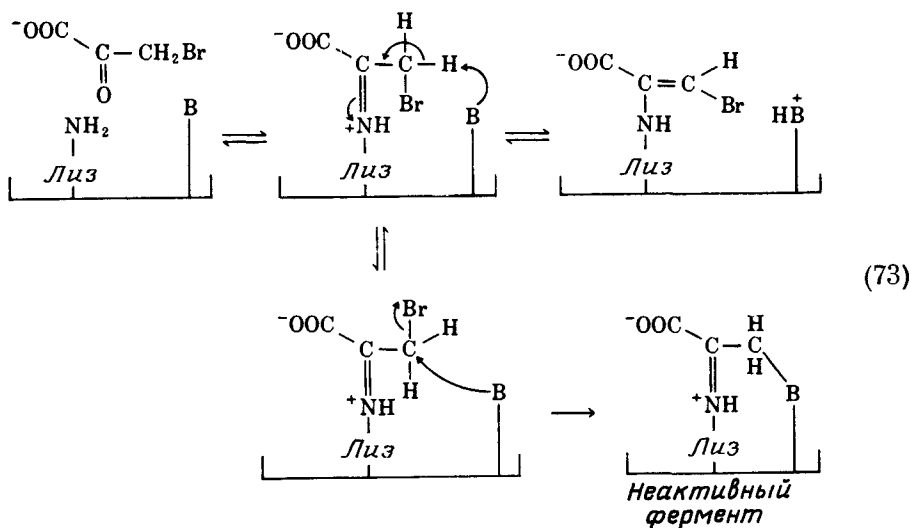
Катализируемое аминами отщепление протона может вызывать целую серию реакций, которые хорошо иллюстрирует весьма сложная схема ферментативного превращения 2-кето-3-дезоксид- L-арабината в полуальдегид α -кетоглутарата [схема (72)] [131]. Наличие стадий 1 и 2, протекающих с образованием и распадом промежуточного фермент-субстратного имина, подтверждается тем, что в присутствии субстрата и при действии боргидрида натрия происходит необратимая инактивация фермента, сопровождающаяся ковалентным присоединением 1 моля субстрата к ферменту. Кроме того, фермент катализирует обмен атомов водорода, находя-



щихся в α -положении по отношению к карбонильной группе в молекуле аналогов субстрата. За образованием енамина (стадия 2) следует дегидроксигенирование (стадия 3) и затем потеря второго атома водорода (стадия 4). Наконец, промежуточное соединение стереоспецифически присоединяет 2 протона (в положения 3 и 4), принимая их от растворителя. При этом образуется иминальдегид (стадия 5), который гидролизуется с образованием продукта (стадия 6).

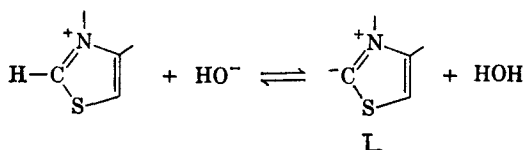
Так как реакции, катализируемые аминами, имеют очень много сходных черт, то можно предположить, что если фермент катализирует одну из них, то он способен катализировать и другие. Для альдозазы, расщепляющей 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат до пировиноградной кислоты и глицеральдегид-3-фосфата, было найдено, что это действительно так [127]. Помимо катализа альдольной конденсации, этот фермент катализировал енолизацию производных пировиноградной кислоты (на что указывает быстрый обмен водорода в метильной группе субстрата), а также *декарбоксилирование* оксалоацетата, которое протекает лишь в 200 раз медленнее, чем суммарная реакция. Кроме того, интересно отметить, что этот фермент подвергается необратимому ингибированию под действием бромзамещенного пирувата. Этот ингибитор присоединяется, по-видимому, к ферменту так же, как и пируват, однако затем он инактивирует фермент, алкилируя некоторую основную группу активного центра. Не исключено, что эта основная группа участвует в механизме ферментативного действия при

отщеплении протона от молекулы пирувата {схема (73)} [132].



4. ТИАМИНПИРОФОСФАТ *

Несмотря на то что многие реакции, катализируемые тиаминопирофосфатными ферментами, уже были воспроизведены на модельных системах, механизмы этих интересных реакций удалось объяснить лишь после того, как Бреслоу было показано, что тиазольевые соли претерпевают под действием растворителя катализируемый основаниями быстрый обмен атома водорода в положении 2. Это наблюдение свидетельствует, что данное положение в молекуле тиазольевой соли является сильно кислотным и благодаря этому легко образуется карбанион или ирид (L) [134]. Для данной модельной реакции проведено мало детальных кинетических исследований,

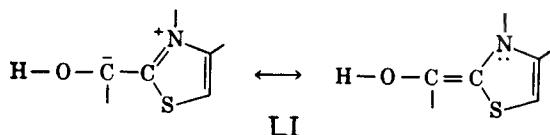


и, более того, в большинстве случаев не удалось однозначно доказать, что синтетические промежуточные соединения участвуют также и в ферментативных системах. Это связано с тем, что ассоциация и диссоциация комплексов тиаминопирофосфата и его производных с ферментом протекают обычно медленно по сравнению со скоростью самой ферментативной реакции. Тем не менее промежуточные соединения обнаруживают все-таки активность в присутствии ферментов, а механизмы, которые были предложены для объяснения этих реакций, являются настолько изящными и разумными, что трудно усомниться в их справедливости, по крайней мере в том, что касается их существования.

Для реакций, катализируемых тиаминопирофосфатом, трудно представить себе лучший катализатор, чем этот кофермент. Носителем каталитической активности в его молекуле служит положительно заряженный атом азота, присоединенный двойной связью к атому углерода в положении 2. Благодаря близости к этому атому положительно заряженный азот электростатически стабилизирует карбанион или ирид (L) и тем самым

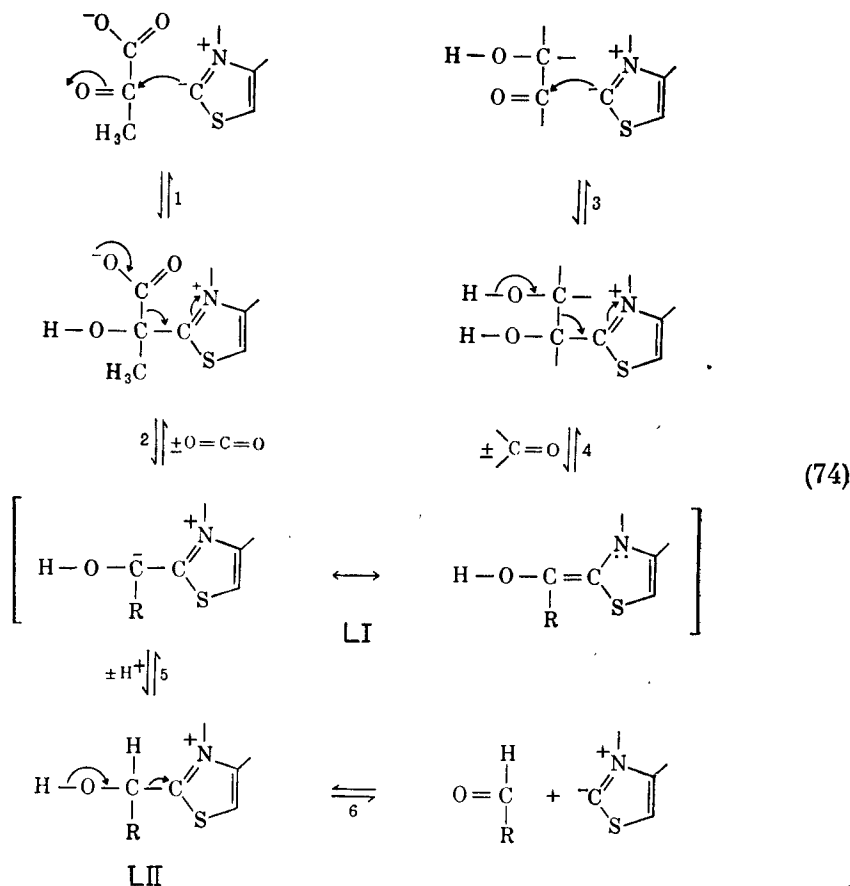
* Современный подробный обзор каталитических реакций с участием тиамина и пиридоксала дан в работе [133].

способствует отщеплению протона, карбонильной или ацильной группы, присоединенных в этом положении. Наряду с этим можно было бы указать и на другие свойства тиазольного цикла (в том числе на sp^2 -гибридизацию атома углерода), способствующие ионизации. Однако наиболее интересная особенность, которую проявляет молекула тиаминпирофосфата, заключается в том, что сам положительно заряженный иминный атом азота может выступать в качестве ловушки электронов и стабилизировать тем самым возникновение отрицательного заряда на *соседнем* атоме углерода, занимающем положение 2 в цикле (LI).



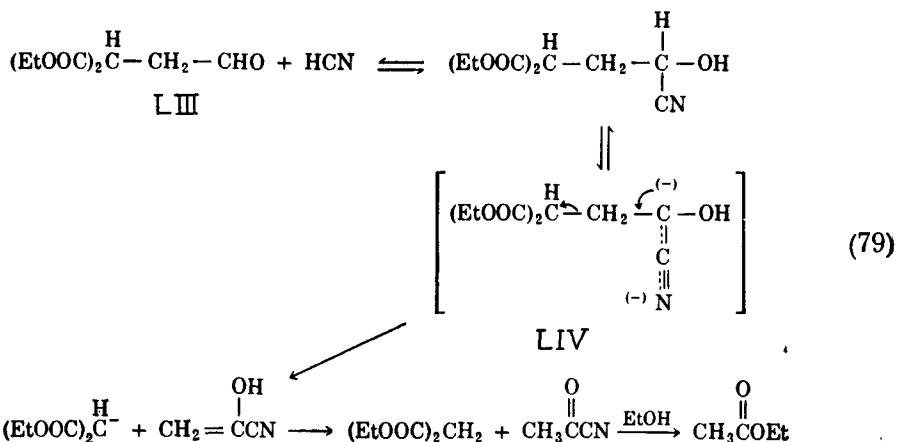
Именно благодаря этой стабилизации, которая происходит путем резонансного взаимодействия через двойную связь к атому азота, становятся возможными декарбоксилирование, альдольная конденсация и расщепление, дегидратация и окисление — процессы, для протекания которых необходимо образование отрицательного заряда в этом положении.

На первой стадии реакций, катализируемых тиаминпирофосфатом, происходит обычно ионизация тиамина с образованием карбаниона L, который присоединяется затем к карбонильной группе пирувата или оксикетона [схема (74), стадии 1 и 3]



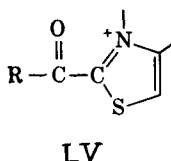
Благодаря взаимодействию с циклом тиамина появляется возможность образования отрицательного заряда на том атоме углерода субстрата, который вначале входил в карбонильную группу, что и обуславливает легкость декарбоксилирования или деальдолиза (стадии 2 и 4). В качестве промежуточного соединения образуется енамин (LI), который после протонизации дает замещенное оксиметильное производное тиамина (LII). Последнее соединение представляет собой одно из тех ключевых промежуточных соединений, которые одно время считали настолько нестабильными, что их невозможно было синтезировать или выделить. Однако позднее оказалось, как это обычно и бывает в случае таких промежуточных соединений, что при подходящих условиях некоторые из них не только достаточно стабильны для выделения, но и могут быть легко синтезированы. Реакция синтеза идет, например, в концентрированном водном растворе альдегида просто в результате спонтанного присоединения тиазолиевого соединения к альдегиду. Более того, тиаминпирофосфат существует *in vivo* большей частью именно в этой форме. Было показано, что синтетические промежуточные соединения этого типа обнаруживают активность в большинстве ферментативных реакций, катализируемых тиаминпирофосфатом. Однако, как уже было отмечено выше, вследствие медленной ассоциации и диссоциации комплексов этих производных кофермента с ферментом, а также, возможно, из-за малой скорости ионизации этих соединений образование продукта в реакциях с этими синтетическими промежуточными соединениями происходит значительно медленнее, чем в нормальной ферментативной реакции. На то, что присоединение к тиазолиевому циклу действительно приводит к активации, указывает тот факт, что в диапазоне pH 8—9 протон этого замещенного оксиметилированного продукта присоединения обменивается с протонами среды благодаря обратимой стадии 5 [135]. Однако этот обмен идет медленно, по крайней мере в отсутствие фермента, и поэтому представляется вероятным, что в некоторых случаях промежуточный карбанион енамина (LI) реагирует далее непосредственно без протонирования.

Атом углерода промежуточного карбаниона енамина LI реагирует с электрофильными акцепторами в качестве нуклеофила. В результате атаки протона этим нуклеофильным центром образуется стабильное промежуточное соединение LII, расщепление которого приводит к альдегиду; по этому механизму из пирувата образуется ацетальдегид (стадии 5 и 6). Реакция карбонильной группы с соединением LI [схема (75)], которая представляет собой фактически обратную реакцию процесса деальдолиза [схема (74), стадии 3 и 4], дает в качестве продукта оксикетон. По этому механизму протекают реакции, катализируемые транскетолазой. В результате атаки промежуточного соединения LI окислителем [уравнение (76)] теряется электронная пара и образуется ацилтиамин, который в свою очередь может отдать ацильную группу молекуле воды (с образованием свободной кислоты) или другим акцепторам (например, фосфату или тиолу), что дает в качестве продукта ацилфосфат или сложный эфир тиола, и сохраняется, таким образом, энергетически богатый характер связи ацилтиамина. Сочетание этих двух процессов эквивалентно суммарной реакции оксиэтилтиаминпирофосфата с окисленной липоевой кислотой, в результате чего образуется энергетически богатый тиоловый эфир восстановленной липоевой кислоты; пока еще неизвестно, протекает ли данная реакция в одну стадию, как это показано в виде схемы (77), или в две отдельные стадии. И наконец, если рядом с анионным атомом углерода находится гидроксильная группа, она может отщепляться с образованием енола, который в результате перегруппировки дает ацилтиамин. При наличии неорганического фосфата в итоге образуется ацетилфосфат [схема (78)]. В целом этот процесс представляет собой внутреннюю реакцию

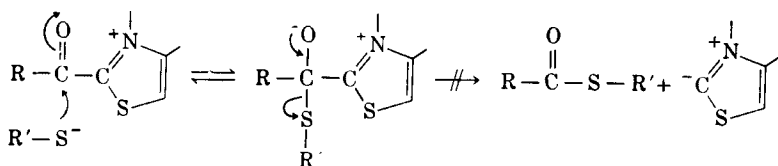
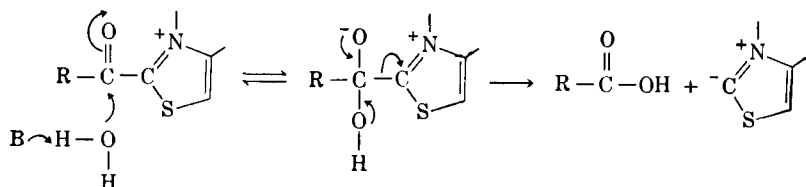


В этом анионе происходит отщепление аниона диэтилмалоната с образованием енола ацилцианида, который после кетонизации реагирует далее с растворителем с образованием этилацетата.

Ацилтиазолий (LV) — это еще одно промежуточное соединение,



которое считали исключительно нестабильным; оказалось, однако, что оно стабильно даже в воде при низкой концентрации ионов гидроксила [137, 138]. Свойства этого соединения служат особо наглядной иллюстрацией тех факторов, от которых зависит протекание реакции переноса ацильной группы. Вода, тиолы и фосфаты — все эти соединения в водном растворе присоединяются к карбонильной группе 2-ацетил-3,4-диметилтиазолиевого иона, образуя при этом вполне ощутимые количества тетраэдрических соединений присоединения, которые считают обычно промежуточными соединениями реакций переноса ацильной группы к этим нуклеофильным реагентам [схемы (80) и (81)]



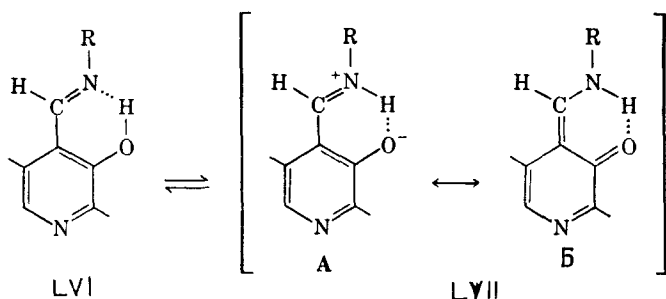
Однако дальнейшему превращению в водном растворе подвергается лишь продукт присоединения воды. При присоединении не очень основных анионов тиола и фосфата вместо вытеснения ильда тиазола с образованием про-

дуктов происходит, как правило, обратное отщепление этих относительно хороших уходящих групп с образованием исходных реагентов. Достаточно эффективное отщепление илида тиазола с образованием продуктов реакции происходит лишь в результате присоединения иона гидроксила, так как в этом случае движущей силой реакции может стать нагнетание электронов от обоих атомов кислорода [137].

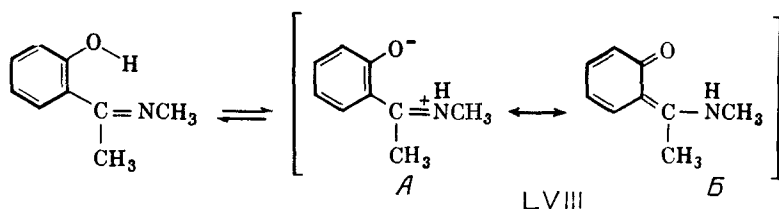
Реакция переноса ацильной группы к тиолам протекает в растворителях с низким содержанием воды, где отсутствует заметная конкуренция этой реакции со стороны гидролиза [139]. Этот же тип реакции должен иметь место и в тех ферментативных реакциях, где после окисления замещенных оксиметилтиаминов до соответствующих ацилтиаминов вместо продуктов гидролиза образуются сложные эфиры тиолов и ацилфосфаты.

5. ПИРИДОКСАЛЬ *

На первой стадии превращений аминокислот (катализируемых пиридоксалем или родственными ему соединениями) как в химических, так и ферментативных системах происходит присоединение аминокислоты к карбонильной группе катализатора с образованием основания Шиффа, которое можно обнаружить по характерной для него желтой окраске, соответствующей второму из двух максимумов поглощения вблизи 330 и 410 нм. Обычно полагают, что строение этого промежуточного соединения соответствует структуре LVI, и в таком виде ее до сих пор часто приводят. Реакция аминов с 3-оксипиридин-4-альдегидом приводит к продуктам, которые также имеют желтую окраску, и их спектр поглощения похож на спектры соединений пиридоксала с аминокислотами. Однако если атом водорода фенола заместить на метильную группу, то желтая окраска и соответственно полоса поглощения вблизи 410 нм исчезают, в то время как полоса поглощения вблизи 330 нм усиливается [140]. Инфракрасные спектры поглощения этих соединений более похожи на спектры амидов, чем на спектры простых иминов [141]

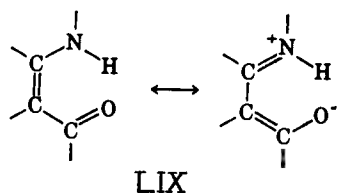


Кроме того, известно, что в полярных растворителях протон в соединении LVIII находится большей частью на атоме азота, а не кислорода (расщеп-

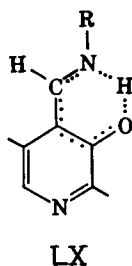


* Современный подробный обзор катализа с участием пиридоксала дан в работе [133].

ление на ^{15}N в спектрах ЯМР [142]). Эти факты вместе взятые дают убедительное доказательство, что в водных растворах эти соединения существуют частично в форме LVII, которая имеет желтую окраску, частично в форме LVI, которой соответствует полоса поглощения при 330 нм. Можно полагать, что структура LVII представляет собой резонансный гибрид двух форм — биполярный катион имина (LVII, структура А), который более стабилен в полярных растворителях, и амидохиноидный продукт (LVII, Б). Структура LVII отличается от LVI лишь тем, что протон, связанный водородной связью, перенесен от кислорода к азоту. Может показаться, что в структуре LVII, Б отсутствует резонанс ароматического кольца. Однако он, несомненно, поддерживается за счет вклада структуры LVII, А, и стабильность структуры LVII становится совсем очевидной, если принять во внимание, что эта структура есть не что иное, как виниловый аналог амида, в котором карбонильная и азотная функциональные группы разделены двойной связью и сохраняется типичный амидный резонанс (LIX). Моноимины β -дикетонов существуют, как правило, в форме



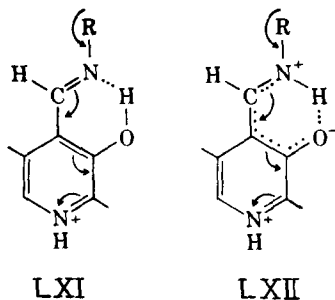
подобного енамина, соответствующего енольной форме исходного кетона и значительно стабилизированного за счет резонанса. Тот факт, что пиридоксальные основания Шиффа имеют две отдельные полосы поглощения, соответствующие структурам LVI и LVII, означает, что эти соединения существуют в виде смеси двух таутомерных форм, а не как резонансный гибрид LX, в котором атом водорода находится в одной потенциальной яме между атомами азота и кислорода и является участником своеобразной



полуароматической резонирующей системы [143]. Доля продукта, находящегося в форме LVII, уменьшается, если к амину присоединить электроноттягивающую группу, которая уменьшит его основность. Для оксима можно наблюдать только коротковолновую полосу поглощения, соответствующую форме LVI.

Несмотря на то что не следует забывать, что продукты взаимодействия пиридоксала с аминами существуют в виде двух структурных форм, рассмотренных выше, тем не менее выводы о механизме действия пиридоксала не слишком отличаются для двух этих структурных форм. При рассмотрении классической структуры передачу электронной плотности в цикл

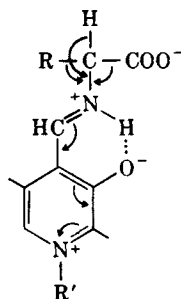
можно записать в виде схемы LXI. С другой стороны, если учесть, что



структура хиноидного амина LVI, Б обладает свойствами неполной двойной связи, сдвиг электронов по тому же пути можно представить в виде структуры LXII. В структуре LXII на атоме азота основания Шиффа имеется более положительный заряд, чем в LXI. Этот положительный заряд, стабилизированный частичным отрицательным зарядом на фенольном атоме кислорода, служит дополнительной движущей силой, способствующей оттягиванию электронов. На это указывает тот факт, что активность аналогов пиридоксала в неферментативных реакциях значительно уменьшается или она вообще отсутствует, если эти соединения не содержат ОН-группы в положении 3 [144]. Пиридиновый атом азота в пиридоксалье-вом основании Шиффа имеет $pK \sim 5,9$, и поэтому при нейтральных значениях pH значительная часть его должна существовать в виде LXII, т.е. с протонированным атомом азота кольца [145]. В случае самого пиридоксала его биполярная форма является даже более стабильной, так как значения pK , соответствующие потере протона фенольной гидроксильной группой и пиридиновым атомом азота, равны 4,2 и 8,7 соответственно. Такая последовательность значений pK для этих групп, противоречащая обычным представлениям, была установлена однозначно сравнением спектров и кислотно-основных свойств оксипиридиновых модельных соединений, содержащих метильные группы у пиридинового атома азота и фенольного атома кислорода. Эти необычные значения pK для данных групп свидетельствуют о том, что пиридиновый атом азота оказывает большое влияние на ионизацию фенольной группы, усиливая ее кислотные свойства, и наоборот, фенолят-ион влияет на пиридиновый атом азота, усиливая его основность [146].

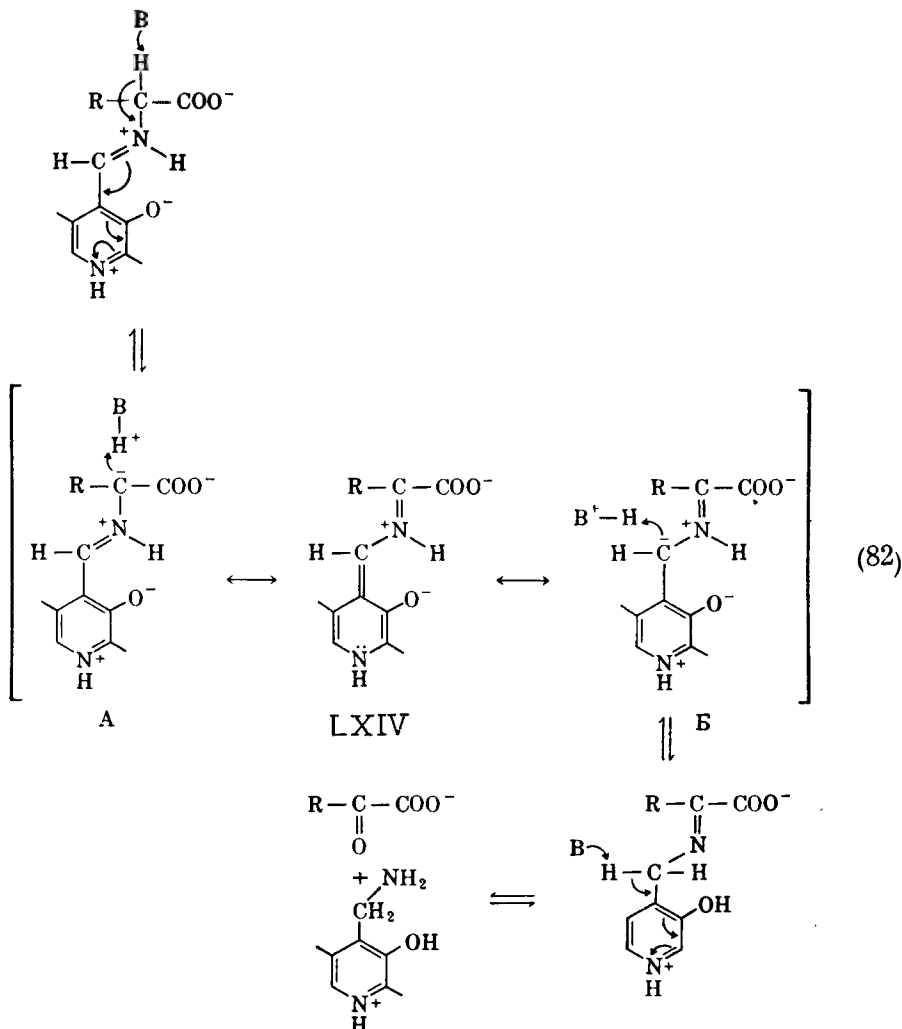
Говорят, что бог создал организмы, специально приспособленными для того, чтобы помочь ответить биологам на любой вопрос, касающийся физиологии живых систем. Если это так, то следует заключить, что пиридоксальфосфат был создан именно для того, чтобы утолить любопытство тех энзимологов и химиков, которые находят наслаждение в «игре с электронами», ибо нет другого кофермента, который бы принимал участие в столь разнообразных ферментативных и модельных реакциях (которые в свою очередь можно разумно объяснить на основании химических свойств этого соединения). Большинство этих реакций, на первый взгляд представляющихся совсем разными, обусловлено одним и тем же структурным свойством пиридоксальфосфата. А именно в промежуточном соединении LXIII происходит оттягивание электронов от α -атома углерода присоединенной к пиридоксальфосфату аминокислоты по направлению к катионному азоту имида и далее в пиридоксальный цикл. В результате сдвига электронов все три заместителя при атоме α -углерода становятся активными в тех реакциях, для которых необходимым условием является оттягивание электронов от этого атома углерода (LXIII, $R' = H$ или же в некоторых

модельных соединениях $R' = \text{алкил}$)



LXIII

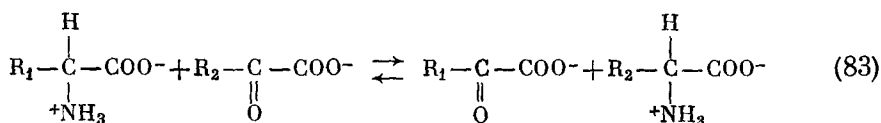
Для значительно меньшего числа реакций требуется аналогичная активация β -атома углерода, происходящая под действием того же иминного атома азота. Тем не менее если принять оба эти положения, то на их основании можно объяснить почти все реакции, для которых было показано, что в них принимает непосредственное участие пиридоксальфосфат.



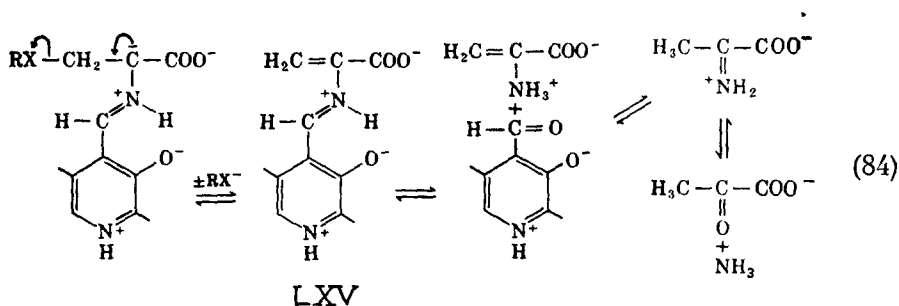
Предлагаемые объяснения являются в основном результатом умозрительных заключений, однако многие из этих реакций удалось уже воспроизвести в модельных системах. Те немногочисленные подробные исследования их механизмов, которые были до сих пор выполнены, подтверждают представления о механизме действия пиридоксальфосфата, которые впервые были детально сформулированы Снеллом и Браунштейном и их сотрудниками [147].

Рассмотрим вначале три типа реакций, общим для которых является оттягивание электронов от трех заместителей при α -атоме углерода аминокислоты.

а) *Отщепление протона от α -атома углерода.* Отщепление протона от α -атома углерода — важнейшая реакция, промотируемая пиридоксальфосфатом. В этой реакции образуется стабилизированное промежуточное соединение [схема (82), LXIV,], которое можно считать карбанионом аминокислоты (LXIV, структура А) или основания Шиффа пиридоксамина (LXIV, структура В). Этот промежуточный продукт представляет собой исходное соединение для целого ряда последующих реакций. Обратное присоединение протона к тому же атому углерода в аминокислоте, но с противоположной стороны, приводит к рацемизации. Присоединение протона к карбонильному атому углерода пиридоксаля дает основание Шиффа пиридоксамина и α -кетокислоты, которое затем гидролизуется [схема (82)]. Этот процесс, идущий в обратном направлении с участием различных α -кетокислот, приводит к регенерации пиридоксаля и к образованию новой аминокислоты. Поэтому суммарным результатом реакции, протекающей в соответствии с уравнением (82) в обоих направлениях, является трансминирование α -амино- и α -кетокислот [схема (83)].



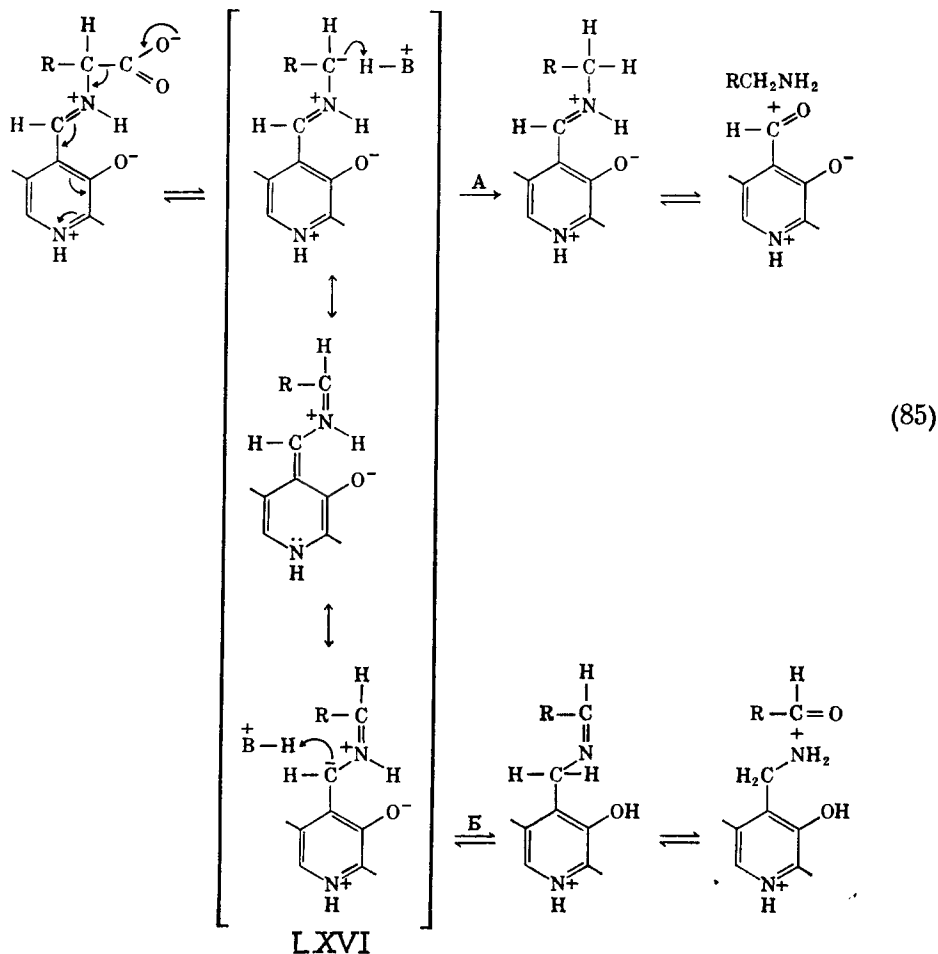
Если при β -атоме углерода имеется хорошая уходящая группа, то наличие электронной пары на анионоподобном промежуточном соединении служит движущей силой для отщепления этой группы с образованием ненасыщенного соединения LXV



Образовавшийся продукт может далее либо гидролизаться и в результате перегруппировки дать пируват, либо он может присоединить новый анион $\text{R}'\text{X}^-$ (по реакции, обратной первоначальному отщеплению), что приведет к образованию новой аминокислоты $\text{R}'\text{XCH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ [схема (84)]. Реакции этого типа, протекающие с участием кислородных, тиоловых и индольных групп, выступающих в роли как уходящих, так и атакующих реагентов, ответственны за катализируемые пиридоксалем реакции

расщепления и взаимного превращения серина, треонина, фосфатов серина и треонина, цистеина, цистатионина и триптофана.

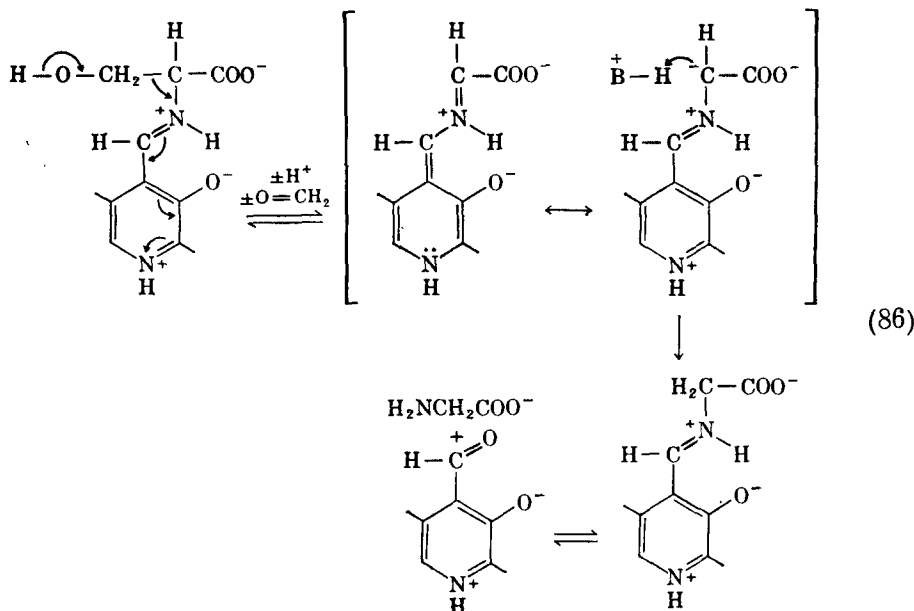
б) *Оттягивание электронов присоединенной аминокислоты от карбоксильной группы.* Результатом именно такого сдвига электронов является декарбоксилирование. Эта реакция приводит к образованию аниона LXVI, подобно рассмотренному выше промежуточному соединению LXIV



Соединение LXVI может присоединить протон либо к оставшейся части аминокислоты и дать при этом простой продукт декарбоксилирования [уравнение (85), путь А], либо к пиридоксалью с образованием производного пиридоксамина, который затем гидролизуетсся до пиридоксамина и альдегида или кетона (путь Б).

в) *Оттягивание электронов из боковой цепи.* Оттягивание электронов из боковой цепи соответствующих аминокислот, например серина, приводит к реакции отщепления. В случае серина в качестве начальных продуктов образуются формальдегид и анионоподобное промежуточное соединение, которое затем присоединяет протон к α -атому углерода и дает в качестве конечного продукта глицин [уравнение (86)].

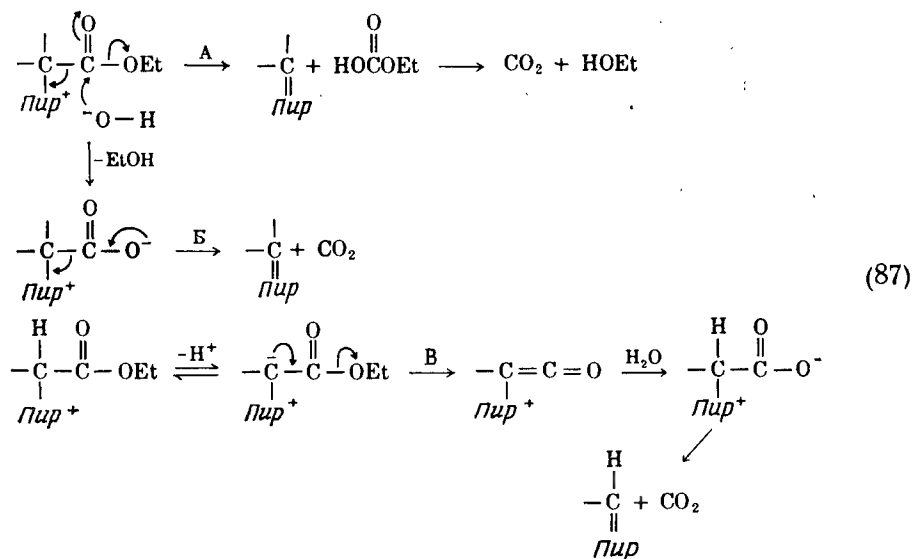
Большинство этих реакций, для протекания которых необходима активация при α -атоме углерода, идет также и в неферментативных процессах при взаимодействии производных пиридоксали с соответствующими



шими аминокислотами или кетокислотами в присутствии ионов металлов при повышенной температуре [133, 147]. Роль фермента частично может выполнять ион металла — он сближает реагенты в подходящем относительном расположении и вносит в реакцию дополнительный электрофильный центр, содействующий оттягиванию электронов. Это, однако, не отражает сущности ферментативного катализа, поскольку было показано, что некоторые очищенные ферменты с пиридоксальфосфатом в качестве кофермента не содержат в молекуле металлов. Детальные кинетические исследования механизмов этих реакций в отсутствие ионов металлов начали проводить лишь в последнее время. Было показано, что реакция трансаминирования включает общий кислотно-основной катализ и скорость определяющей стадией процесса является либо отщепление протона от α -атома углерода аминокислоты, либо присоединение протона к карбонильному атому углерода пиридоксали, как это показано на схеме (82) [148, 144]. В реакции с аланином скорость процесса определяется отщеплением протона, на что указывает наличие изотопного эффекта при использовании дейтерированного аланина [144]. Реакция трансаминирования α -аминофенилуксусной кислоты в присутствии пиридоксали и имидазола подчиняется сложной кинетике, свидетельствующей об участии в катализе двух молекул имидазола при его низких концентрациях и о достижении предела по скорости реакции при его высоких концентрациях, что указывает на образование промежуточного комплекса [149]. Не исключено, что катализ протекает по механизму согласованного отщепления и присоединения протона; однако в более простых реакциях подобного рода согласованный катализ, по-видимому, отсутствует (гл. 3, разд. Г,2), и поэтому окончательная трактовка кинетических данных для этой системы потребует дополнительных исследований.

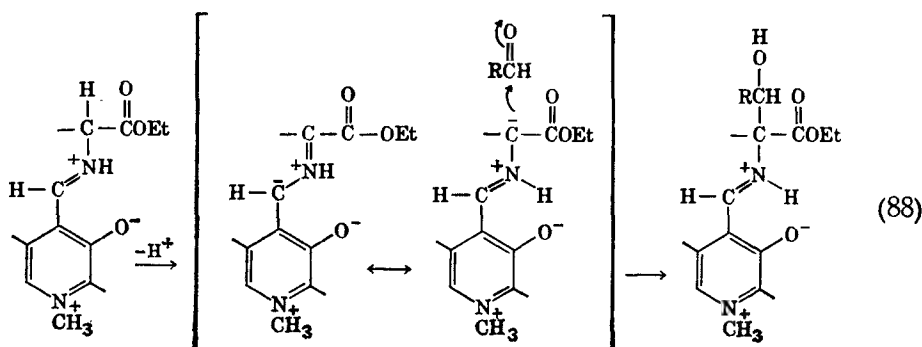
Промежуточное соединение LXIV, которое играет основную роль в механизме катализа, пока не удалось однозначно идентифицировать. Однако имеются данные, свидетельствующие, что оно образуется и накапливается в модельных системах при реакциях производных пиридоксали с аминокислотами, содержащими в молекуле заместители, обладающие сильными электронооттягивающими свойствами. Аминомалонат и α -метиламиномалонат претерпевают декарбоксилирование в присутствии производных

пиридоксаль при физиологических температурах, по-видимому, в соответствии с механизмом, представленным в виде схемы (85) [150, 151]. Менее согласующимся с обычными представлениями является тот факт, что диэтиловый эфир аминомалоновой кислоты быстро гидролизуются и претерпевает декарбоксилирование в присутствии 10^{-5} М пиридоксальфосфата при pH 6 [150]. Очевидно, кофермент оказывает электронооттягивающее влияние и тем самым облегчает протекание этой реакции, содействуя расщеплению углерод-углеродной связи либо до [уравнение (87), путь А],

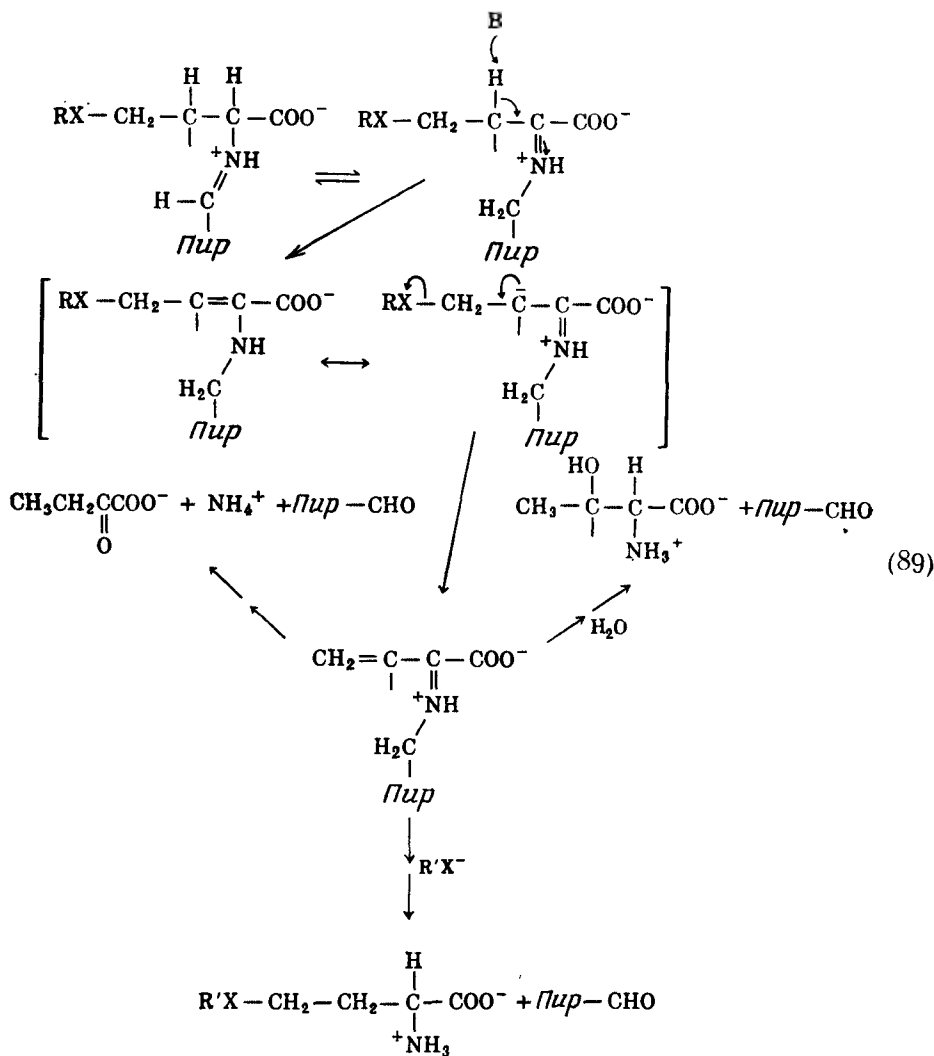


либо после [уравнение (87), путь Б] гидролиза сложноэфирной группы. Не исключено, что реакция идет по пути отщепления этанола с образованием кетена и с последующим присоединением воды и декарбоксилированием [уравнение (87), путь В]. Наконец, возможно, что реакция протекает по механизму внутримолекулярной атаки эфирной группы аминоспиртом, образовавшимся из пиридоксальфосфата и аминомалонового эфира, подобно тому, как это происходит в реакции гидролиза *n*-нитрофенилового эфира лейцина, катализируемой бензальдегидом (гл. 1, разд. Б).

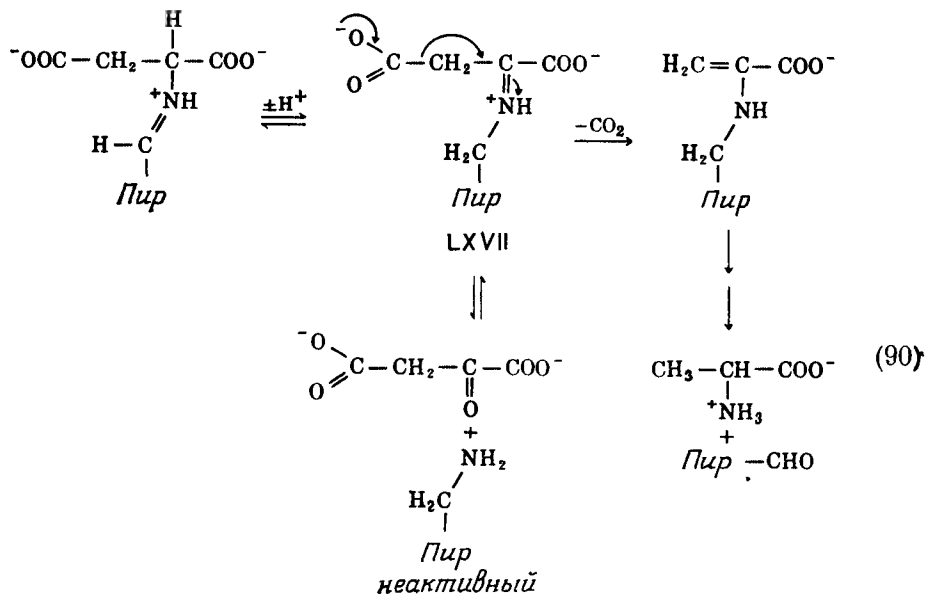
Наиболее важное наблюдение, связанное с этой реакцией, заключается в том, что при смешивании пиридоксальфосфата с диэтиловым эфиром аминомалоновой кислоты быстро образуется промежуточное соединение, для которого характерна полоса поглощения с максимумом при 460 нм. В спектрах простых производных пиридоксальфосфата этот максимум поглощения отсутствует, и поэтому кажется вероятным, что на самом деле это промежуточное соединение представляет собой ключевой промежуточный анион LXIV. На справедливость этого указывает также тот факт, что в этаноле из *N*-метилпиридоксальфосфата и диэтиламинмалоната образуется аналогичное соединение с максимумом поглощения при 480 нм. Это соединение может вступать в реакцию с альдегидами с образованием, по-видимому, оксиметилированного продукта присоединения {схема (88)} [152]. При этом исчезает полоса поглощения при 480 нм. Известно, что продукт взаимодействия аминомалоновой кислоты и пиридоксальфосфата также либо декарбоксилируется, либо присоединяется к альдегидам с образованием α -амино- β -оксикислот. Эта реакция идет, по-видимому, через подобное же промежуточное соединение [151]. В реакции превращения аланина до пирувата, которая идет в присутствии катиона *N*-метилпиридин-4-альдегида, образуется промежуточное соединение с максимумом



поглощения при 500 нм, которое имеет, по-видимому, аналогичное строение [153]. Во многих ферментативных реакциях также были обнаружены промежуточные соединения с максимумом поглощения вблизи 500 нм. Их строение, по-видимому, подобно структуре промежуточного соединения LXIV [154].



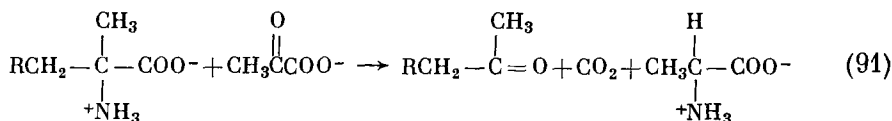
Для протекания некоторых ферментативных реакций с участием пиридоксальфосфата (например, β -декарбоксилирование или γ -отщепление) необходима активация тех атомов углерода, которые менее тесно связаны с пиридоксальевым циклом, чем α -атом углерода аминокислоты. Роль активирующей группы в этих реакциях выполняет, по-видимому, протонированный атом азота основания Шиффа. После отщепления протона от α -атома углерода эта группа способствует отщеплению протона от β -атома углерода. При этом образуется промежуточное соединение типа β -карбанион-енамина. Как видно [схема (89)], механизм этой реакции похож на механизм альдольной конденсации, катализируемой аминами. Образовавшееся промежуточное соединение способно также легко отщеплять хорошую уходящую группу от γ -атома углерода. Именно так протекает расщепление цистотионина и отщепление фосфата от фосфогомосерина в процессе синтеза треонина [схема (89)]. Ненасыщенный продукт, образовавшийся в реакции отщепления, может либо присоединить нуклеофил к любому положению по двойной связи, либо гидролизоваться и перегруппироваться в несколько стадий *). Аналогичный механизм наблюдается, по-видимому, также и при β -декарбоксилировании. В данном случае катионный атом азота в основании Шиффа активирует субстрат так, что вместо отщепления протона идет декарбоксилирование [схема (90)]. Эти реакции не удалось



пока наблюдать в модельных системах, вероятно, потому, что в отсутствие фермента быстрее протекают другие, более простые реакции. Интересно, что в отсутствие карбонильных соединений происходит постепенная инактивация аспартат- β -декарбоксилазы, вызванная гидролизом промежуточного основания Шиффа LXVII до пиридоксаминфосфата и α -кетокислоты; в отсутствие избытка пиридоксальфосфата или карбонильного соединения, приводящих к регенерации активной пиридоксальевой формы, пиридокс-аминовая форма комплекса фермент-кофермент не способна катализировать превращение аминокислоты [155].

* Студентам полезно выписать хотя бы некоторые из множества возможных (но не доказанных) механизмов, которые можно предложить для этих стадий, а также для заключительных стадий приведенной ниже реакции β -декарбоксилирования.

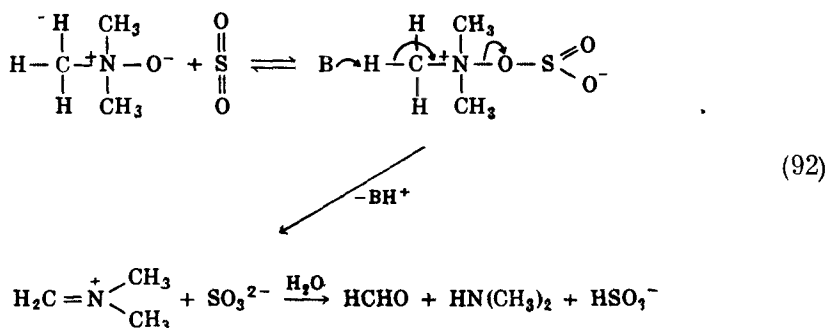
Катализ серин-трансоксиметилазой реакции медленного трансаминирования D-изомера аланина с образованием пирувата и пиридоксамин-фосфата представляет собой несколько иной пример этих каталитических механизмов [156]. Еще одним примером является сопряженное декарбоксилирование и трансаминирование α -диалкиламинокислот бактериальными ферментами {схема (91)} [157].



В этой реакции анионоподобное промежуточное соединение должно возникать непосредственно в результате декарбоксилирования, так же как и в аналогичной неферментативной полуреакции [158]. Вполне возможно, что специфичность пиридоксальных ферментов по отношению к каждому типу катализируемых реакций зависит от стереоспецифичности связывания субстрата на ферменте. Благодаря этому в сферу действия активного центра вовлекается та связь, которая подвергается разрыву с образованием анионоподобного промежуточного соединения [159].

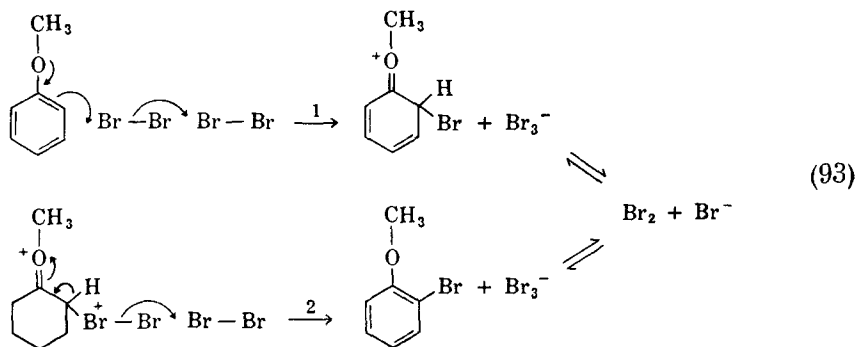
6. ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ

Заслуживают внимания также и некоторые другие реакции, в которых промотирование отщепления одной из групп субстрата обусловлено ковалентным присоединением электрофильного активатора, отличающегося от протона. Распад N-окиси триметиламина в водном растворе происходит в присутствии двуокиси серы через образование продукта присоединения, в котором атом кислорода N-окиси приобретает свойства хорошей уходящей группы. В этом продукте присоединения может произойти отщепление протона от метильной группы с образованием катиона имина, который быстро гидролизуется до формальдегида и диметиламина {схема (92)} [160].

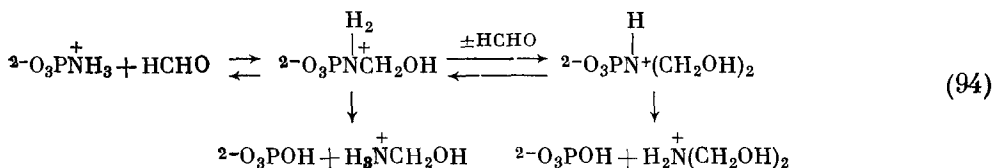


Поскольку в определенных условиях отщепление воды от сульфита регенерирует двуокись серы, то эту реакцию можно, по крайней мере в принципе, считать истинным катализом под действием SO_2 .

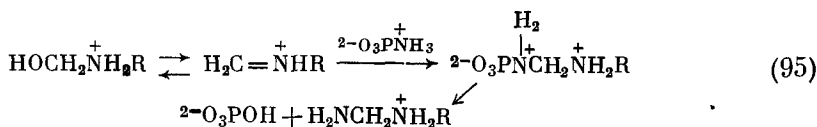
Выражение для скорости реакции бромирования анизолла содержит член второго порядка по концентрации брома [161]. Это указывает на каталитическое действие второй молекулы брома, которая может содействовать вытеснению иона брома на начальной стадии процесса [схема (93), стадия 1] или, возможно, в промежуточном продукте присоединения [схема (93), стадия 2]. В любом случае каталитическое действие обусловлено стабильностью иона Br_3^- , при последующем распаде которого регенерируется Br_2 .



Скорость гидролиза амидофосфата заметно возрастает в присутствии формальдегида, который присоединяется к аминогруппе субстрата с образованием моно- или диоксиметилированных продуктов присоединения [162]. Зависимость скорости процесса от концентрации реагентов содержит члены первого и второго порядка по концентрации формальдегида. Кинетическое исследование показало также, что в большинстве экспериментальных условий переходное состояние катализируемой реакции содержит заряд -1 . На этом основании механизм реакции можно представить в виде схемы (94):



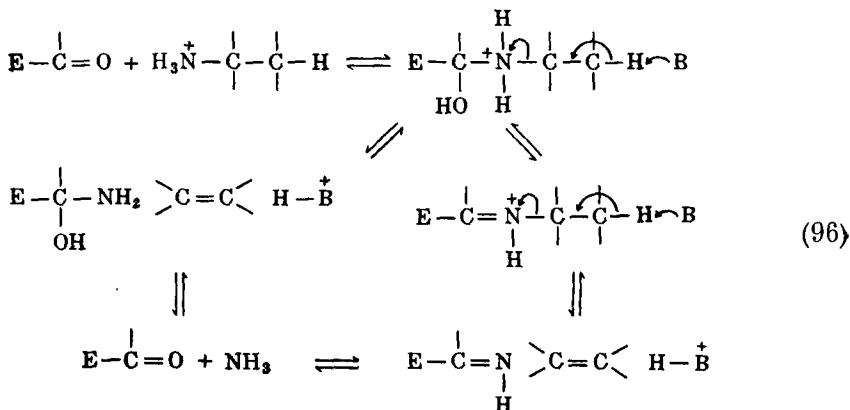
Дополнительное ускорение реакции происходит в присутствии аминов или аммиака, которые могут присоединяться к формальдегиду и амидофосфату с образованием продукта присоединения, содержащего два положительных заряда в уходящей группе [схема (95)]. Наличие каталитических путей в этой реакции весьма знаменательно



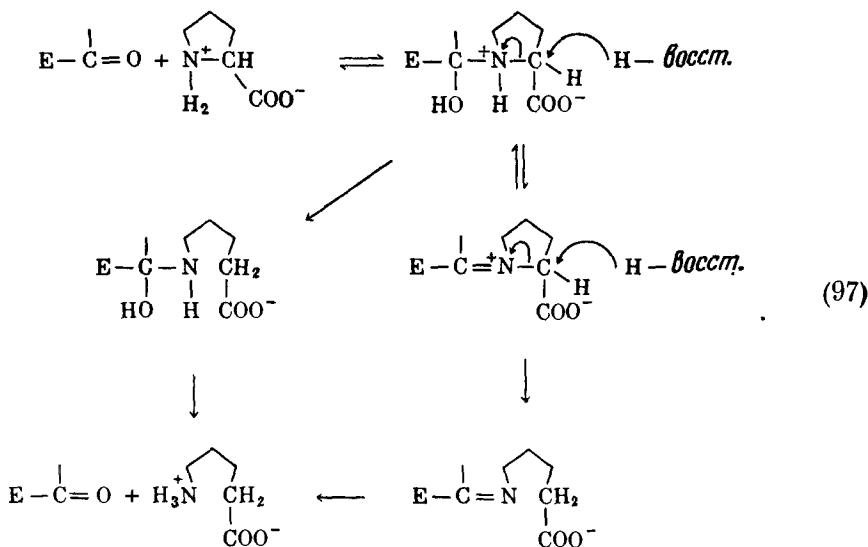
так как монозамещенные фосфаты обнаруживают очень высокую чувствительность к природе уходящей группы. Усиление реакционной способности аминогруппы амидофосфата в реакции отщепления, которое происходит в результате ее взаимодействия с формальдегидом или продуктом присоединения формальдегида к амину, приводит к ускорению реакции даже в том случае, если протонированный продукт присоединения присутствует лишь в небольшой концентрации. Реакция представляет собой истинный катализ, поскольку продукты реакции могут распадаться с регенерацией формальдегида, и, кроме того, они сами обнаруживают каталитическую активность.

Подобный механизм катализа имеет место, по-видимому, в ферментативных реакциях дезаминирования гистидина [163] и восстановления D-пролина [164]. Имеются данные, свидетельствующие, что в обеих этих реакциях аминогруппа субстрата соединяется с карбонильной группой фермента. В результате этого амин становится лучшей уходящей группой либо за счет протонирования, либо при дегидратации до катиона основания Шиффа. В реакции, катализируемой гистидазой, происходит образование

промежуточного соединения фермент-амин, которое значительно быстрее, чем протекает его гидролиз, может вступать в реакцию обмена с ненасыщенным продуктом урокановой кислоты, образуя при этом меченый гистидин {схема (96)} [165]



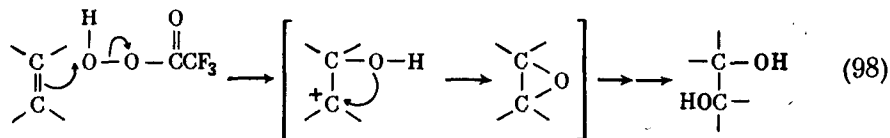
При восстановлении D-пролина взаимодействие с карбонильной группой приводит к тому, что аминогруппа становится более восприимчивой к восстановлению или замещению. Это иллюстрирует схема (97), где представлен механизм раскрытия цикла под действием гидрид-иона. Карбонильная группа пролинредуктазы представляет собой кето-группу молекулы пиру-



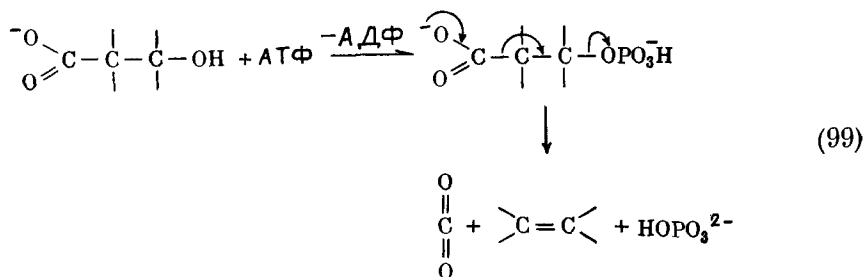
вата, ковалентно связанной с ферментом. Под действием боргидрида натрия, а также реагентов, модифицирующих карбонильную группу, происходит инактивация фермента [164].

Ацилирование или фосфорилирование настолько эффективно усиливает реакционную способность гидроксильной группы или аниона кислорода, что становится возможным их замещение. Обычно такой механизм активации не является истинным катализом, а представляет собой процесс, который требует энергетических затрат. Однако в условиях, когда гидроксилсодержащее соединение находится в равновесии с ацилирующим или фосфорилирующим агентом, такая активация может, по крайней мере

в принципе, рассматриваться как каталитический процесс. Так, трифторперуксусная кислота, которая обратимо образуется из трифторуксусной кислоты и перекиси водорода, представляет собой эффективный окислитель не только для гидроксилирования двойных связей [схема (98)], но и для



окисления анилина до нитробензола в условиях, когда сама перекись водорода не реагирует [166]. Среди множества примеров такой активации, происходящей в ферментативных реакциях, укажем на фосфорилирование гидроксильной группы пироглутата мевалоновой кислоты под действием АТФ, что на последующей стадии декарбоксилирования обеспечивает возникновение хорошей уходящей группы {схема (99)} [167]. Другим

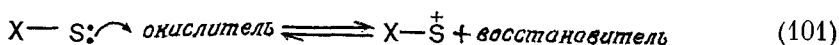
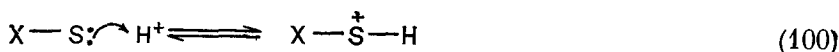


примером является ацилирование гидроксильной группы гомосерина, предшествующее ее отщеплению в реакции конденсации гомосерина с цистеином, катализируемой пиридоксальфосфатом и приводящей к образованию цистатионина [168]. Особенно трудно поддаются катализу простые реакции замещения при насыщенном атоме углерода. В связи с этим интересно отметить, что во многих ферментативных реакциях такого типа (например, конденсации изопреноидов с образованием предшественников холестерина или сложных углеводов, синтезе S-аденозилметионина из метионина и АТФ и, наконец, синтезе витамина В₁₂ из кобамида и АТФ) уходящая гидроксильная группа включается в пиро- или трифосфатную группировку. По-видимому, полифосфаты по своей природе являются лучшими уходящими группами, чем неорганический фосфат, и, кроме того, они структурно хорошо приспособлены для присоединения иона металла и введения напряжения в молекулу, которое дополнительно может облегчить протекание реакции замещения

Е. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ

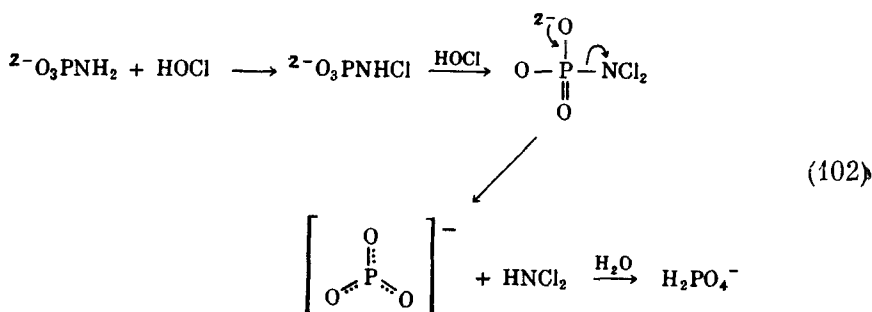
В общем смысле окисление можно определить как процесс удаления электронов из молекулы или атома. Реакционный центр, который претерпевает окисление, будет становиться, таким образом, все более электрофильным, и поэтому реакции, которые промотируются недостатком электронов на реакционном центре, должны ускоряться под действием окислителей, так же как при катализе брэнстедовскими и льюисовскими

кислотами [схема (100) и (101)]



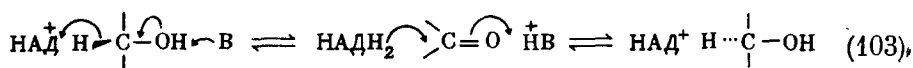
Существует много примеров такого рода активации, которая вызывается окислением, но лишь в немногих случаях активация является каталитической, хотя обратимый окислительно-восстановительный процесс представляется весьма вероятным механизмом, обеспечивающим временное значительное изменение электронной плотности на реакционном центре без большой затраты энергии или локального увеличения эффективной кислотности.

Гидролиз амидофосфата, вызываемый гипохлоритом, является примером неферментативной реакции, в которой наблюдается катализ за счет обратимого окислительного процесса [162]. В разбавленном растворе гипохлорита при нейтральных или слабокислых значениях рН время полупревращения в реакции гидролиза амидофосфата сокращается от нескольких часов (без гипохлорита) до нескольких секунд. Реакция протекает через хлорирование субстрата, сперва с образованием стабильного при высоких значениях рН монохлорпроизводного и затем дихлорпроизводного [схема (102)]

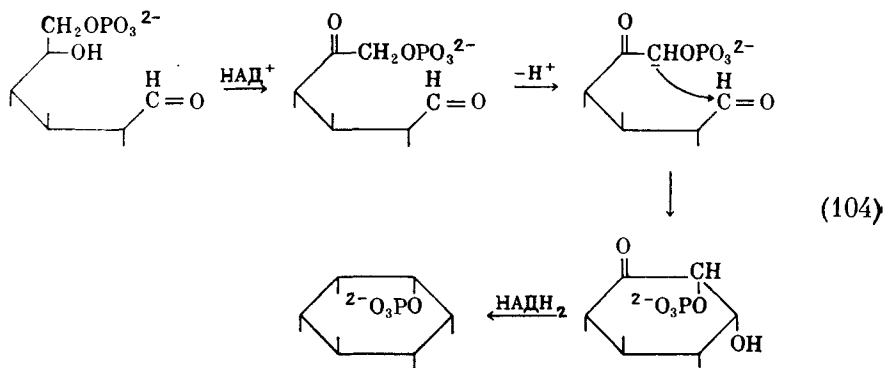


Дихлорамины являются лучшей уходящей группой по сравнению с аммиаком, и дихлорированное соединение немедленно превращается в дихлорамины и неорганический фосфат, возможно, через образование промежуточного мономерного метафосфатного моноаниона. Процесс является каталитическим, поскольку продукт реакции хлорамина может, хотя и с меньшей скоростью, чем гипохлорит, хлорировать исходное соединение, вызывая дальнейший гидролиз.

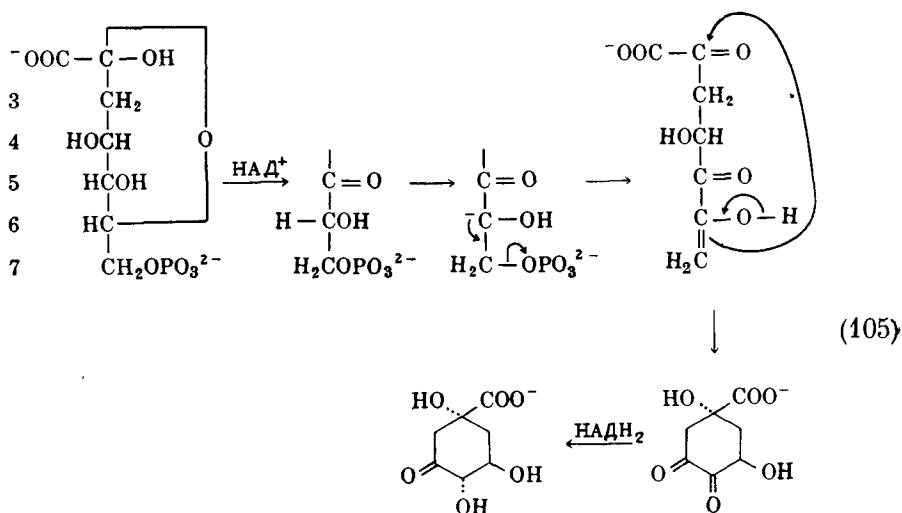
Обратимое окисление — восстановление как механизм, обеспечивающий низкоэнергетический путь каталитической реакции, наблюдается в некоторых ферментативных реакциях, однако при этом обычно не происходит непосредственной активации уходящей группы. Ярким примером является реакция, катализируемая уридиндифосфатгалактозо-4-эпимеразой [169]. Этот фермент содержит прочно связанную молекулу никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). После прибавления к ферменту субстрата появляется полоса поглощения при 345 нм, характерная для восстановленного кофермента. Эпимеризация, по всей вероятности, включает окисление положения 4, за которым следует восстановление карбонильной группы с противоположной стороны [схема (103)]



Некоторые структурные изменения в молекулах сахаров катализируются ферментами, которые требуют для проявления своей активности присутствия НАД^+ , хотя в конечном итоге это не приводит к окислению субстрата. Несмотря на то что ни в одном случае механизм реакции не был установлен, можно думать, что эти родственные реакции включают обратимое окисление гидроксильной группы до кетонной, что существенно облегчает удаление протона от соседнего атома углерода и делает возможным отщепление или альдольную конденсацию. Одной из таких реакций является циклизация глюкозо-6-фосфата в *мио*-инозитол-1-фосфат [170], в которой окисление спиртовой группы в положении 5 до кетонной должно способствовать конденсации шестого атома углерода с карбонильной группой в положении 1, приводя к замыканию кольца по механизму альдольной конденсации [схема (104)]

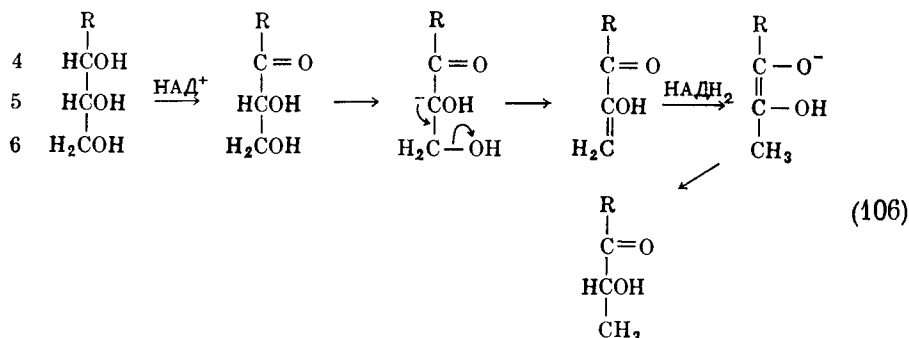


Перегруппировка и замыкание кольца, которые имеют место при синтезе 5-дегидрохината, могут быть объяснены в соответствии со схемой (105) окислением гидроксила в положении 5 до кетона, за которым следует потеря протона в положении 6 и элиминирование фосфата из положения 7, что приводит к образованию енола, который может легко присоединиться



к карбонильной группе в положении 2 с замыканием цикла [171]. Аналогичным способом могут быть объяснены перегруппировки многих нуклео-

зидгексозидифосфатов в 4-кето-6-дезоксипроизводные [172, 173], {схема (106)}

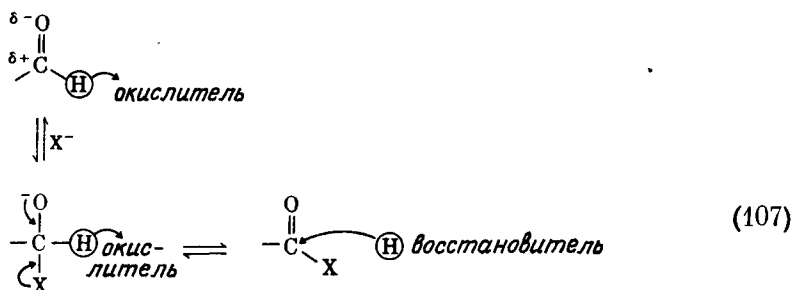


Окисление гидроксила в положении 4 до кетона делает возможным отщепление воды из положений 5—6, за которым следует восстановление в положении 6 и кетонизация конечного енола. Меченый водород из положения 4 субстрата переносится в положение 6 молекулы продукта реакции, и, кроме того, наблюдается включение меченого водорода растворителя в положение 5 молекулы продукта, что и должно следовать из этого механизма [173].

Обратимое окисление — восстановление представляет собой настолько привлекательный механизм, обеспечивающий низкоэнергетический путь катализа, что автор не может не надеяться, что будут найдены другие ферментативные реакции, которые протекают по этому механизму.

Ж. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ

Окисление альдегида требует удаления атома водорода и двух электронов от атома * углерода, который уже имеет частичный положительный заряд вследствие полярности карбонильной группы [уравнение (107).] Такое окисление может быть облегчено присоединением к карбонильной группе нуклеофильного реагента

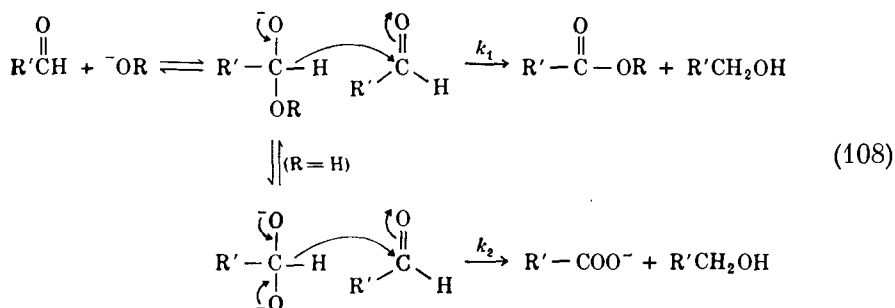


Это облегчает перенос электронов к окисляющему агенту и, кроме того, приводит к образованию ацилированного нуклеофила как первичного промежуточного продукта. Такой результат имеет огромное значение для живых систем, поскольку образование ацилированного нуклеофила позволяет сохранить часть свободной энергии окислительного процесса в форме макроэргической связи продукта реакции. Энергия процесса терялась бы

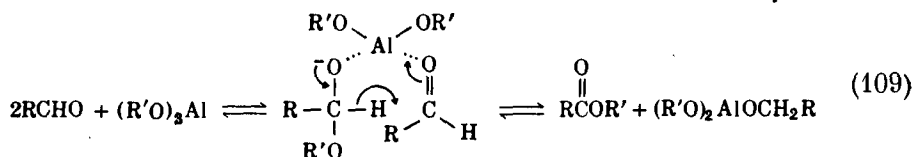
* Окисление альдегида до кислоты требует, вообще говоря, удаления лишь одного электрона. Поскольку автор не оговаривает конечную степень окисления атома углерода, вопрос о количестве удаляемых электронов остается открытым. — Прим. ред.

полностью при окислении альдегида непосредственно в «низкоэнергетический» карбоксилат-ион. Более того, сохранение ацильной группы в форме активированного соединения облегчает процесс ее восстановления при обратной реакции [схема (107)]; неактивированный карбоксилат-ион восстанавливается с большим трудом.

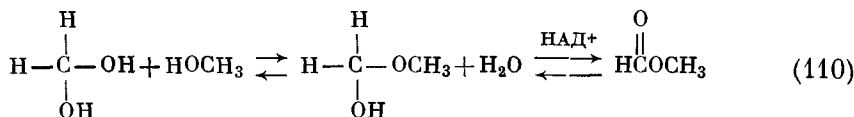
Если реакция проводится в присутствии подходящего нуклеофильного реагента, то указанием на участие в механизме окисления продукта присоединения LXVIII, а не свободного альдегида, может служить образование в качестве продукта реакции не карбоновой кислоты, а ацилированного нуклеофила. Так, окисление альдегидов бромом [174] и хромовой кислотой [175] в присутствии спирта, а также другой молекулой альдегида в реакциях Канниццаро [176] и Тищенко [177] приводит к образованию эфира. Уравнение скорости для реакции Канниццаро содержит члены как первого, так и второго порядка относительно концентрации основания {схема (108)} [178]. Член второго порядка указывает на возросшую тенденцию к переносу водорода в виде гидрид-иона, который, возможно, происходит через образование дианиона гидрата альдегида [схема (108), k_2]. В случае



полуацетала, который образуется в результате присоединения спирта, возможна лишь однократная ионизация, и перенос водорода должен осуществляться от моноаниона, приводя к образованию в качестве продукта реакции непосредственно сложного эфира [схема (108), k_1]. Реакция Тищенко — дисмутация альдегида в спирт и эфир, катализируемая алко-голем алюминия, по-видимому, протекает по внутримолекулярному варианту того же механизма {схема (109)} [179]

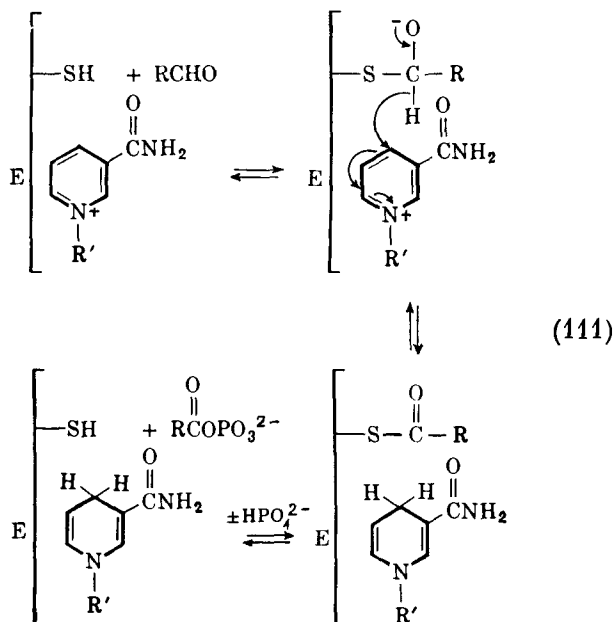


Примерами ферментативного окисления альдегидов до эфиров являются реакции окисления полуацеталей сахаров, в которых происходит образование лактонов в качестве первичных продуктов, а также окисление формальдегида и метанола до метилформиата, катализируемое алко-гольдегидрогеназой {схема (110)} [180].



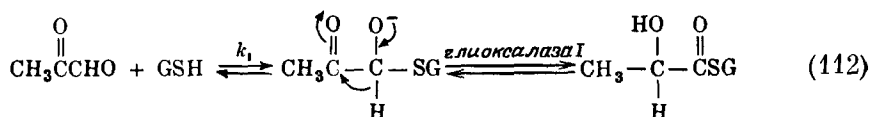
Окисление полутиоацеталей до «энергетически богатых» тиоловых эфиров, которые имеют большое биологическое значение, облегчается

высокой способностью тиоловой группы присоединяться к карбонильным соединениям. Реакция, катализируемая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, почти определенно включает присоединение субстрата к сульфгидрильной группе активного центра фермента, что приводит к образованию полутиоацетала, за которым следует перенос гидрид-иона к НАД⁺ - образованием тиоэфира, и, наконец, перенос ацила на неорганический фосфат с образованием ацилфосфата [схема (111)].

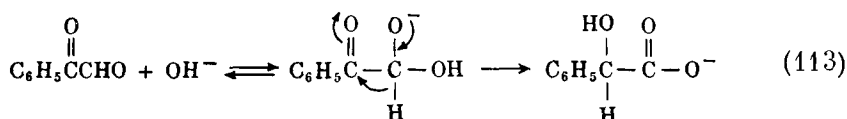


Аналог нормального субстрата D-треозо-2,4-дифосфат окисляется до стабильного промежуточного фермент-тиолового эфира, который может быть выделен и который реагирует с гидроксиламином, давая гидроксамовую кислоту, но не взаимодействует с фосфатом с образованием ацилфосфата, по-видимому, вследствие присутствия в молекуле двух фосфатных групп [181].

Фермент глиоксалаза I катализирует внутримолекулярное окисление — восстановление метилглиоксала в присутствии глутатиона, образуя тиоловый эфир молочной кислоты и глутатион [GSH, схема (112)]. Как эта реакция, так и аналогичная реакция

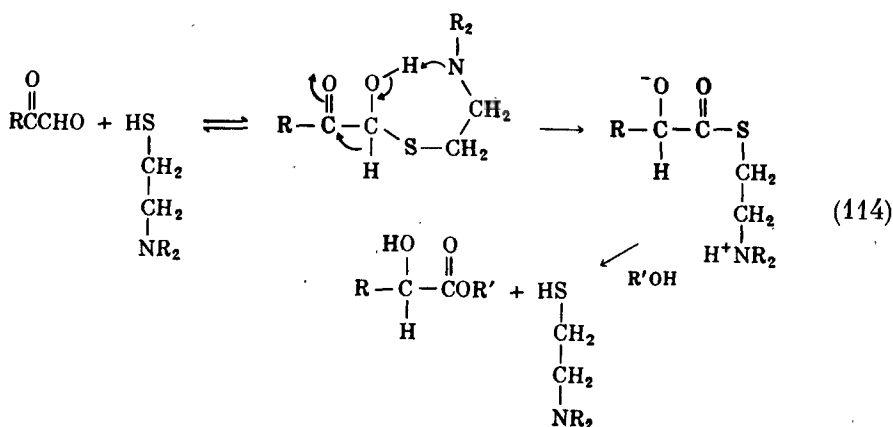


внутримолекулярной дисмутации фенолглиоксала в миндальную кислоту, катализируемая ионом гидроксила [схема (113)], протекают без обмена мигрирующего атома водорода со средой, что позволяет предположить наличие механизма гидридного переноса [182]

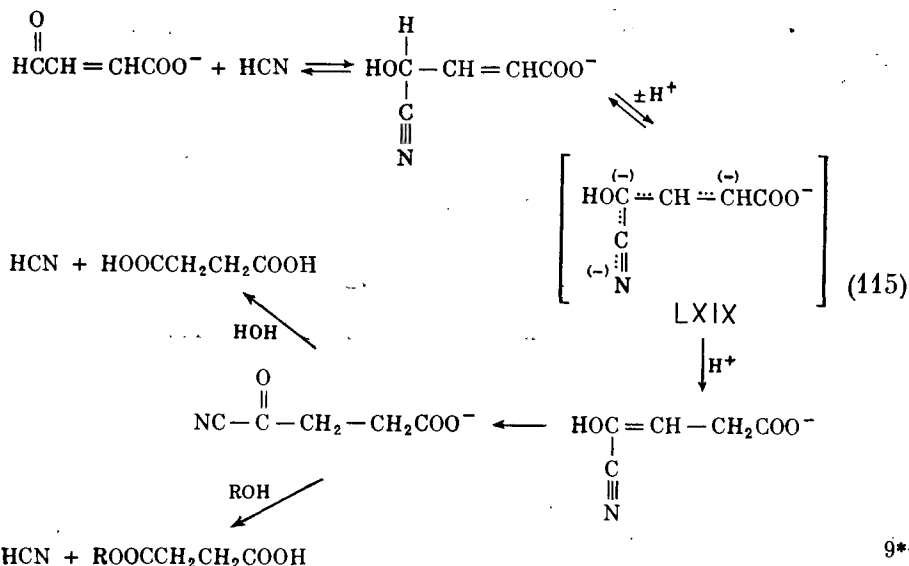


Доказательством того, что субстратом ферментативной реакции является полуацеталь, служит тот факт, что наблюдаемая скорость реакции не зависит от концентрации фермента при его высоких концентрациях, если реакция начинается добавлением глутатиона, однако скорость становится зависящей от концентрации фермента, если глутатион и метилглиоксаль инкубируются совместно перед добавлением фермента [183]. В первом случае образование полуацеталя из глутатиона и метилглиоксаля [k_1 , уравнение (112)] является скоростью определяющей стадией, так что увеличение концентрации фермента не повышает скорости реакции.

В метаноле или в воде при pH 7,5 эта реакция катализируется диметилцистатином, но не катализируется ни триметиламином, ни тиолом [184]. Эта модельная реакция также протекает без обмена водорода с растворителем, и можно полагать, что она включает внутримолекулярное промотирование гидридного переноса, как это показано на схеме (114). Детальное кинетическое исследование этой реакции представляло бы значительный интерес



Образование из альдегида активированной ацильной группы в реакции внутреннего окисления — восстановления может быть вызвано также цианид-ионом, но в данном случае имеет место, по-видимому, совершенно другой механизм {схема (115)} [136].

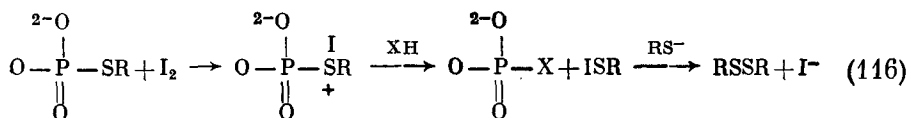


Присоединение цианида к альдегиду с образованием циангидрина делает возможным потерю протона с образованием резонансно-стабилизированного аниона LXIX. Обратное присоединение протона, но уже к атому углерода, соседнему с карбоксильной группой, с последующей кетонизацией дает ацилцианид — активный ацилирующий агент, который быстро реагирует с водой или спиртом, давая предельную кислоту или эфир.

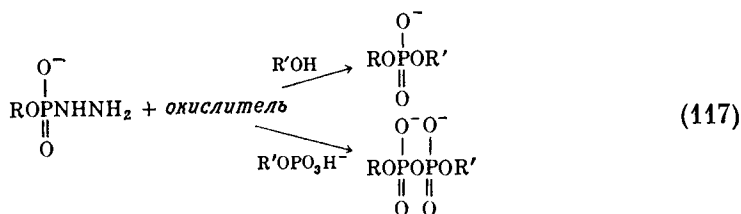
Окислительная активация карбоновой кислоты и, возможно, также фосфата сульфидом в присутствии иода была описана в гл. 1, разд. В.

Одной из основных проблем современной биохимии является выяснение механизма превращения энергии, выделяющейся в результате взаимодействия связей C — H с кислородом с образованием двуокиси углерода и воды в энергию фосфоангидридной связи АТФ — единой «платежной единицы» в процессах переноса химической энергии, используемой для большого числа синтетических и метаболических функций. Если энергетическое сопряжение имеет химический механизм (хотя это еще не очевидно [185]), то оно может происходить либо непосредственно через окисление некоторых легко образующихся «низкоэнергетических» фосфатных производных до «высокоэнергетических» форм, которые могут затем переносить фосфат на АДФ, давая АТФ, либо через окисление некоторых других «низкоэнергетических» молекул до «высокоэнергетических» форм, которые могут дать макроэргический фосфат через серию реакций переноса. В последнее время стало известно несколько примеров такого активационного процесса, в котором происходит образование высокоэнергетического тиолового эфира при окислении альдегида. Тиоловый эфир может реагировать дальше, давая ацилфосфат и при известных обстоятельствах АТФ. Этот тип активации является ответственным за образование макроэргических фосфатных связей на «субстратном уровне» фосфорилирования, в котором метаболит, подвергающийся окислению, превращается в активированный продукт. В настоящее время, однако, еще нет уверенности, что аналогичный процесс происходит при многоступенчатом переносе электронов между субстратом и кислородом, который является ответственным за освобождение большей части энергии в аэробном метаболизме. Интерес к этой проблеме стимулировал поиски реакций, в которых фосфатная группа превращается в энергетически богатую форму посредством окислительного процесса, что может служить моделью реакций с природным коферментом. Хотя в настоящее время еще нет доказательств, что какой-либо процесс такого рода ответствен за окислительное фосфорилирование, эти исследования интересны с химической точки зрения и в качестве источника некоторых потенциально полезных синтетических методов.

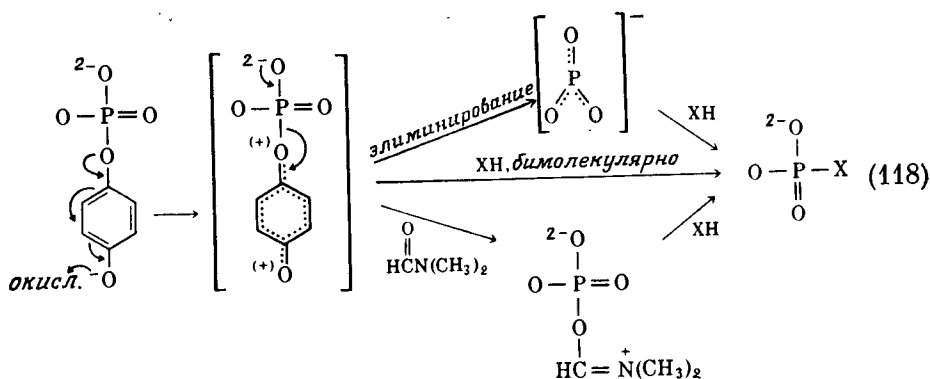
Одним из простейших примеров активации фосфата посредством окисления является перенос фосфорильной группы тиоловых эфиров фосфорной кислоты на воду или другие акцепторы, который индуцируется окислением иодом {схема (116)} [186]. Подобным же образом окисление фосфогидразидов приводит к переносу фосфатной



группы к акцепторам (при использовании спиртов получают эфиры, при использовании фосфатов — пиррофосфаты) и иллюстрирует возможное применение этого типа активации в синтетической химии {уравнение (117)} [187]

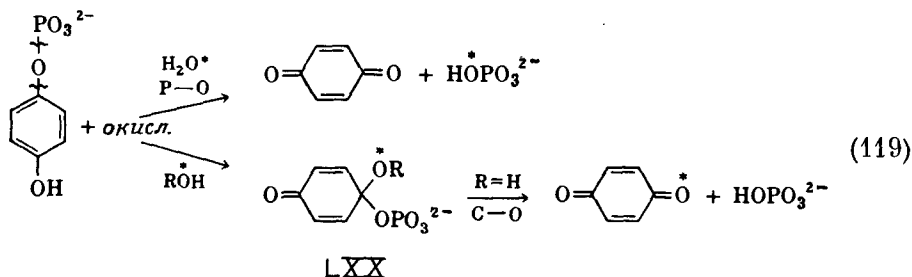


Очень интересно изучение окисления гидрохинонфосфатов, так как хинонные группы витамина К, витамина Е и коэнзима Q могут претерпевать обратимое окисление — восстановление и участвовать в механизме транспортировки электронов при окислительном фосфорилировании. Окисление гидрохинонфосфатов некоторыми окислительными агентами приводит к гидролизу фосфата, а при низком содержании воды — к переносу фосфорильной группы на акцептор, которым может служить другая молекула фосфата, что приводит к образованию пирогосфата в качестве продукта [188, 189]. Детальный механизм этих реакций неизвестен, но принцип окислительной активации можно проиллюстрировать схемой (118). Оттягивание электронов

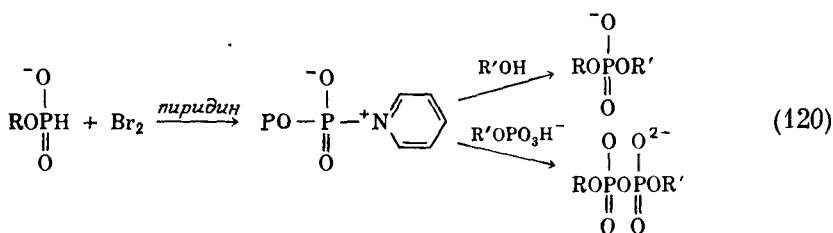


от связи фосфат — кислород, которое осуществляется за счет окислительного процесса, делает этот кислород центром хорошей уходящей группы и облегчает отщепление фосфата либо реакцией бимолекулярного замещения с акцептором, либо через мономолекулярное элиминирование с образованием моноаниона метафосфата, который реагирует с акцептором на последующей стадии. Растворитель может принимать непосредственное участие в этих реакциях: диметилформамид, например, действует в качестве переносчика активированного фосфата в форме имидофосфата, который реагирует с акцептором на конечной стадии [190]. Привлекательность этих реакций в качестве модельных была в некоторой степени уменьшена в результате опытов с водой, меченной по кислороду, в которых было показано, что только часть индуцированного окислением гидролиза протекает с переносом фосфата на воду; реакция идет главным образом с расщеплением связи С — О и представляет собой скорее результат активации хинонового кольца, чем фосфата {схема (119)} [191]. В метаноле в качестве основного продукта реакция

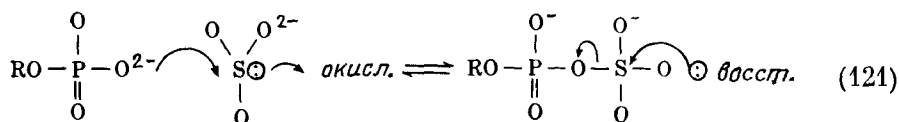
дает продукт присоединения LXX ($R = CH_3$) [192]



Особенно яркий пример образования активированного фосфата за счет окислительного процесса представляет собой окисление бромом эфиров фосфониевой кислоты в пиридине с образованием диэфиров фосфорной кислоты или пиродифосфатов {схема (120)} [193]



Эта реакция аналогична окислению альдегидов до активированных ацилсоединений, но, по-видимому, протекает по другому механизму, в соответствии с чем удаление электронов приводит к переносу фосфата на растворитель с образованием активного промежуточного фосфорилпиридиния, за которым следует перенос фосфата на акцептор. Аналогичной реакцией, важной с биологической точки зрения, является реакция обратимого окисления сульфита в присутствии АДФ или АМФ с образованием энергетически богатого смешанного ангидрида фосфорной и серной кислот [схема (121)].



Было показано, что очищенный фермент, катализирующий эту реакцию с участием АМФ, содержит флавинадениндинуклеотид, железо и каталитически активную сульфгидрильную группу [194]. Эта реакция является наиболее простым и непосредственным примером окислительной активации в биологической системе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Massey V., Gibson Q. H., Veeger C., Biochem. J., 77, 341 (1960).
2. Hartley B. S., Kilby B. A., Biochem. J., 56, 288 (1954).
3. Sartorelli L., Fromm H. J., Benson R. W., Boyer P. D., Biochemistry, 5, 2877 (1966); Tokuyama H., Kubo S., Tonomura Y., Biochem. Z., 345, 57 (1966) and references therein.
4. McDonald C. E., Balls A. K. J. Biol. Chem., 227, 727 (1957).
5. Kézdy F. J., Clement G. E., Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 86, 3690 (1964).
6. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B., J. Am. Chem. Soc., 84, 2540 (1962); ibid 84, 2562 (1962).

7. Inward P. W., Jencks W. P., J. Biol. Chem., 240, 1986 (1965); Caplow M., Jencks W. P., Biochemistry, 1, 883 (1962).
8. Bernhard S. A., Gutfreund H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 1238 (1965).
9. Kirsch J. F., Igelström M., Biochemistry, 5, 783 (1966).
10. Gutfreund H., Sturtevant J. M., Biochem. J., 63, 656 (1956).
11. Inagami T., Sturtevant Jy My
11. Inagami T., Sturtevant J. M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 69 (1964).
12. Caplow M., Jencks W. P., J. Biol. Chem., 239, 1640 (1964).
13. Epand R. M., Wilson J. B., J. Biol. Chem., 238, 1718 (1963); *ibid.*, 240, 1104 (1965).
14. Alberty R. A., Advan. Enzymol., 17, 1 (1956); Dalziel K., Acta Chem. Scand., 11, 1706 (1957); Cleland W. W., Biochim. Biophys. Acta, 67, 104 (1963); *ibid.*, 67, 173 (1963); *ibid.*, 67, 188 (1963).
15. Fromm H. J., Zewe V., J. Biol. Chem., 237, 1661 (1962).
16. Velick S. F., Vavra J., J. Biol. Chem., 237, 2109 (1962).
17. Massey V., Veeger C., Ann. Rev. Biochem., 32, 579 (1963).
18. Ray W. J., Jr., Roscelli G. A., J. Biol. Chem., 239, 1228 (1964); Mourad N., Parks R. E., Jr., *ibid.*, 241, 271 (1966).
19. Silverstein R., Voet J., Reed D., Abeles R. H., J. Biol. Chem., 242, 1338 (1967).
20. Hersh L. B., Jencks W. P., J. Biol. Chem., 242, 3468 (1967); *ibid.*, 242, 3481 (1967).
21. Henson C. P., Cleland W. W., Biochemistry, 3, 338 (1964).
22. Koshland D. E., Jr., in Mechanisms of Enzyme Action (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), J. Hopkins Press, Baltimore, 1954 p. 608.
23. Voet J., Abeles R. H., J. Biol. Chem., 241, 2731 (1966).
24. Rupley J. A., Gates V., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 496 (1967); Pollock J. J., Chipman D. M., Sharon N., Arch. Biochem. Biophys., 120, 235 (1967).
25. Hass L. F., Byrne W. L., J. Amer. Chem. Soc., 82, 947 (1960).
26. Bruce T. C., Schmir G. L., J. Am. Chem. Soc., 79, 1663 (1957); 80, 148 (1958); Bender M. L., Turnquest B. W., *ibid.*, 79, 1656 (1957); Brouwer D. M., Vlugt M. J., Havinga E., Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. (Amsterdam), B 60, 275 (1957).
27. Jencks W. P., Carriuollo J., J. Biol. Chem., 234, 1272 (1959); *ibid.*, 234, 1280 (1959); Wolfenden R., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., 83, 4390 (1961).
28. Stadtman E. R., in Mechanisms of Enzyme Action (W. D. McElroy and B. Glass, eds.), J. Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 581; Gerstein J., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., 86, 4655 (1964).
29. Anderson B. M., Cordes E. H., Jencks W. P., J. Biol. Chem., 236, 455 (1961).
30. Jencks W. P., Carriuollo J., J. Am. Chem. Soc., 83, 1743 (1961).
31. Kundig W., Ghosh S., Roseman S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 1067 (1964); Kreil G., Boyer P. D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 551 (1964); Mitchell R. A., Butler L. G., Boyer P. D., *ibid.*, 16, 545 (1964) and references therein.
32. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Amer. Chem. Soc., 87, 3199 (1965).
33. Kirby A. J., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., 87, 3209 (1965).
34. Bruce T. C., Fife T. H., Bruno J. J., Brandon N. E., Biochemistry, 1, 7 (1962).
35. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Amer. Chem. Soc., 84, 2910 (1962).
36. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Amer. Chem. Soc., 82, 1778 (1960).
37. Ogilvie J. W., Tildon J. T., Strauch B. S., Biochemistry, 3, 754 (1964).
38. Rylander P. N., Tarbell D. S., J. Amer. Chem. Soc., 72, 3021 (1950); Morse B. K., Tarbell D. S., *ibid.*, 74, 416 (1952).
39. Lynen F., Reichert E., Rueff L., Ann. Chem., 574, 1 (1951).
40. Connors K. A., Bender M. L., J. Org. Chem., 26, 2498 (1961).
41. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., 84, 826 (1962).
42. Cordes E. H., Jencks W. P., Biochemistry, 1, 773 (1962); Jencks W. P., Cordes E., in Proceedings of Symposium on Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis (E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, A. Rossi Fanelli, eds.), Rome 1962, Pergamon Press, New York, 1963, p. 57.
43. Crowell T. I., Peck D. W., J. Amer. Chem. Soc., 75, 1075 (1953).
44. Crowell T. I., Ramirez F. A., J. Amer. Chem. Soc., 73, 2268 (1951).
45. Patai S., Rappoport Z., J. Chem. Soc., 1962, 396; Rappoport Z., Degani C., Patai S., *ibid.*, 1963, 4513 and references therein.
46. Lack L., J. Biol. Chem., 236, 2835 (1961).
47. Benson S. W., Egger K. W., Golden D. M., J. Amer. Chem. Soc., 87, 468 (1965); Egger K. W., Benson S. W., *ibid.*, 87, 3314 (1965).
48. Park J. H., Koshland D. E., Jr., J. Biol. Chem., 233, 986 (1958).
49. Di Sabato G., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., 83, 4393 (1961).
50. Moelwyn-Hughes E. A., J. Chem. Soc., 1938, 779.
51. Matsukawa T., Yurugi S. J., J. Pharm. Soc. Japan, 71, 1423 (1951); *ibid.*, 72, 33 (1952).
52. Fujita A., Advan. Enzymol., 15, 389 (1954); Kenten R. H., Biochem. J., 67, 25 (1957); *ibid.*, 69, 439 (1958).
53. Swain C. G., Scott C. B., J. Amer. Chem. Soc., 75, 141 (1953).
54. Bruce T. C., Lapinski R., J. Amer. Chem. Soc., 80, 2265 (1958).
55. Dessy R. E., Pohl R. L., King R. B., J. Amer. Chem. Soc., 88, 5121 (1966).

56. Edwards J. O., J. Amer. Chem. Soc., **76**, 1540 (1954).
57. Edwards J. O., J. Amer. Chem. Soc., **78**, 1819 (1956).
58. Pearson R. G., J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3533 (1963); Pearson R. G., Songstad J., *ibid.*, **89**, 1827 (1967).
59. Ahrland S., Chatt J., Davies N. R., Quart. Rev. (London), **12**, 265 (1958).
60. Jørgensen C. K., Structure and Bonding, **1**, 234 (1966); Williams R. J. P., Hale J. D., *ibid.*, **1**, 249 (1966).
61. Lienhard G. E., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 3982 (1966).
62. Parker A. J., Adv. Phys. Org. Chem., **5**, 173 (1967).
63. Parker A. J., J. Chem. Soc., 1961, 1328.
64. Cram D. J., Rickborn B., Kingsbury C. A., Haberfield P., J. Amer. Chem. Soc., **83**, 3678 (1961); Cram D. J., Kingsbury C. A., Rickborn B., *ibid.*, **83**, 3688 (1961).
65. Latimer W. M., Pitzer K. S., Slansky C. M., J. Chem. Phys., **7**, 108 (1939).
66. Parker A. J., Quart. Rev. (London), **16**, 163 (1962); Advan. Org. Chem., **5**, 1 (1965).
67. Parker A. J., Proc. Chem. Soc., 1961, 371.
68. Alexander R., Ko E. C. F., Mac Y. C., Parker A. J., J. Amer. Chem. Soc., **89**, 3703 (1967); Alexander R., Parker A. J., *ibid.*, **89**, 5549 (1967); Case B., Parsons R., Trans. Faraday Soc., **63**, 1224 (1967); Coetzee J. F., Campion J. J., J. Amer. Chem. Soc., **89**, 2517 (1967).
69. Friedman H. L., J. Phys. Chem., **71**, 1723 (1967).
70. Ritchie C. D., Skinner G. A., Badding V. G., J. Amer. Chem. Soc., **89**, 2063 (1967).
71. Hall H. K., Jr., J. Org. Chem., **29**, 3539 (1964).
72. Yagil G., Anbar M., J. Amer. Chem. Soc., **84**, 1797 (1962).
73. Susi H., Zell T., Timasheff S. N., Arch. Biochem. Biophys., **85**, 437 (1959).
74. Covitz F., Westheimer F. H., J. Amer. Chem., **85**, 1773 (1963).
75. Fedor L. R., Bruice T. C., Kirk K. L., Meinwald J., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 108 (1966).
76. Kumamoto J., Cox J. R., Westheimer F. H., J. Amer. Chem. Soc., **78**, 4858 (1956).
77. Johnson S. L., Rumon K. A., J. Amer. Chem. Soc., **87**, 4782 (1965).
78. Bruice T. C., Holmquist B., J. Amer. Chem. Soc., **89**, 4028 (1967).
79. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Amer. Chem. Soc., **90**, 2622 (1968); Pierre T. St., Jencks W. P., *ibid.*, **90**, 3817 (1968).
80. Hine J., J. Org. Chem., **31**, 1236 (1966).
81. Hine J., Weimar R. D., Jr., J. Amer. Chem. Soc., **87**, 3387 (1965).
82. Kallen R. G., Jencks W. P., J. Biol. Chem., **241**, 5864 (1966).
83. Jencks W. P., in «Progress in Physical Organic Chemistry» (S. G. Cohen, A. Streitwieser, Jr., R. W. Taft, eds.), Interscience Pub., Co., New York, Vol. 2, 1964, p. 63.
84. Hall T. N., J. Org. Chem., **29**, 3587 (1964).
85. Sander E., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., **90**, 6154 (1968).
86. Van Eys J., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., **228**, 305 (1957).
87. Hine J., J. Amer. Chem. Soc., **85**, 3239 (1963).
88. Streitwieser A., Jr., Holtz D., J. Amer. Chem. Soc., **89**, 692 (1967); Streitwieser A., Jr., Marchand A. P., Pudjaatmaka A. H., *ibid.*, **89**, 693 (1967).
89. Dostrovsky I., Halmann M., J. Chem. Soc., 1953, 508.
90. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Amer. Chem. Soc., **87**, 3199 (1965).
91. Cruickshank D. W. J., J. Chem. Soc., 1961, 5486.
92. Epstein J., Plapinger R. E., Michel H. O., Cable J. R., Stephani R. A., Hester R. J., Billington C., Jr., List G. R., J. Amer. Chem. Soc., **86**, 3075 (1964).
93. Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., **80**, 4585 (1958).
94. Hassel O., Strømme K. P., Acta Chem. Scand., **13**, 275 (1959).
95. Drago R. S., Wayland B. B., J. Amer. Chem. Soc., **87**, 3571 (1965).
96. Green A. L., Sainsbury G. L., Saville B., Stansfield M., J. Chem. Soc., 1958, 1583.
97. Edwards J. O., Pearson R. G., J. Amer. Chem. Soc., **84**, 16 (1962).
98. Gerstein J., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., **86**, 4655 (1964).
99. Rundle R. E., Record Chem. Progr. Kresge-Hooker Sci. Lib., **23**, 195 (1962).
100. Pimentel G. C., McClellan A. L., The Hydrogen Bond, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1960, p. 236.
101. Spratley R. D., Pimentel G. C., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 2394 (1966).
102. Brühl J. W., Chem. Ber., **28**, 2847 (1895).
103. Gregory M. J., Bruice T. C., J. Amer. Chem. Soc., **89**, 4400 (1967).
104. Streitwieser A., Jr., Solvolytic Displacement Reactions, McGraw-Hill Book Company, New York, 1962, p. 28.
105. Bartlett P. D., Trachtenberg E. N., J. Amer. Chem. Soc., **80**, 5808 (1958).
106. Lowenstein J. M., Biochem. J., **70**, 222 (1958); *ibid.*, **75**, 269 (1966); Biochim. Biophys. Acta, **28**, 206 (1958); Tetas M., Lowenstein J. M., Biochemistry, **2**, 350 (1963).
107. Cohn M., Hughes T. R., Jr., J. Biol. Chem., **237**, 176 (1962); Sternlicht H., Shulman R. G., Anderson E. W., J. Chem. Phys., **43**, 3123 (1965); *ibid.*, **43**, 3133 (1965).
108. O'Sullivan W. J., Cohn M., J. Biol. Chem., **241**, 3104 (1966); Mildvan A. S., Scrutton M. C., Biochemistry, **6**, 2978 (1967).
109. Miller D. L., Westheimer F. H., J. Amer. Chem. Soc., **88**, 1507 (1966); **88**, 1514 (1966).

110. Butcher W. W., Westheimer F. H., J. Amer. Chem. Soc., 77, 2420 (1955); Bunton C. A., Llewellyn D. R., Oldham K. G., Vernon C. A., J. Chem. Soc., 1958, 3574; Di Sabato G., Jencks W. P., J. Amer. Chem. Soc., 83, 4400 (1961); Cox J. R., Jr., Ramsay O. B., Chem. Rev., 64, 317 (1964).
111. Buckingham D. A., Marzilli L. G., Sargeson A. M., J. Amer. Chem. Soc., 89, 2772 (1967); 89, 4539 (1967).
112. Westheimer F. H., Jones W. A., J. Amer. Chem. Soc., 63, 3283 (1941).
113. C. G. Swain, Bader R. F. W., Esteve R. M., Jr., Griffin R. N., J. Amer. Chem. Soc. 83, 1951 (1961); Tsai C. S., Can. J. Chem., 45, 873 (1967).
114. Pedersen K. J., J. Phys. Chem., 38, 559 (1934); J. Amer. Chem. Soc., 60, 595 (1938).
115. Hay R. W., Australian J. Chem., 18, 337 (1965).
116. Cristol S. J., Norris W. P., J. Amer. Chem. Soc., 75, 632 (1953); 75, 2645 (1953); Grovenstein E., Jr., Theophilou S. P., *ibid.*, 77, 3795 (1955); Grovenstein E., Jr., Lee D. E., *ibid.*, 75, 2639 (1953).
117. Guthrie J. P., Westheimer F. H., Fed. Proc., 26, 562 (1967).
118. Hamilton G. A., Westheimer F. H., J. Amer. Chem. Soc., 81, 6332 (1959); Warren S., Zerner B., Westheimer F. H., Biochemistry, 5, 817 (1966).
119. Steinberger R., Westheimer F. H., J. Amer. Chem. Soc., 73, 429 (1951).
120. Broche A., Gibert R., Bull. Soc. Chim. France, 1955, 131; Bell R. P., McTigue P. T., J. Chem. Soc., 1960, 2983.
121. Rose I. A., Brookhaven Symp. Biol., 15, 293 (1962).
122. Westheimer F. H., Cohen H., J. Amer. Chem. Soc., 60, 90 (1938).
123. Hay R. W., Tate K. R., Australian J. Chem., 19, 1651 (1966).
124. Spencer T. A., Neel H. S., Flechtner T. W., Zayle R. A., Tetrahedron Letters, 1965, 3889.
125. Bender M. L., Williams A., J. Amer. Chem. Soc., 88, 2502 (1966); Hine J., Menon B. C., Jensen J. H., Mulders J., *ibid.*, 88, 3367 (1966); Hine J., Kokesh F. C., Hampton K. G., Mulders J., *ibid.*, 89, 1205 (1967).
126. Speck J. C., Jr., Rowley P. T., Horecker B. L., J. Amer. Chem. Soc., 85, 1012 (1963); Horecker B. L., Cheng T., Grazi E., Lai C. Y., Rowley P., Tchola O., Fed. Proc., 21, 1023 (1962).
127. Ingram J. M., Wood. W. A., J. Biol. Chem., 241, 3256 (1966).
128. Cash D. J., Wilson I. B., J. Biol. Chem., 241, 4290 (1966).
129. Rose I. A., O'Connell E. L., Arch. Biochem. Biophys., 118, 758 (1967).
130. Shemin D., Nandi D. L., Fed. Proc., 26, 390 (1967).
131. Portsmouth D., Stoolmiller A. C., Abeles R. H., J. Biol. Chem., 242, 2751 (1967).
132. Meloche H. P., Biochemistry, 6, 2273 (1967).
133. Bruice T. C., Benkovic S. J., Bioorganic Mechanisms, W. A., vol. II, chap. 8, Benjamin, Inc., New York, 1966.
134. Breslow R., J. Amer. Chem. Soc., 79, 1762 (1957).
135. Miesal J. J., Votaw R. G., Sable H. Z., Krampitz L. O., Fed. Proc., 26, 344 (1967).
136. Franzen V., Fikentscher L., Ann. Chem., 623, 68 (1959).
137. Lienhard G. E., J. Amer. Chem. Soc., 88, 5642 (1966).
138. Bruice T. C., Kundu N. G., J. Amer. Chem. Soc., 88, 4097 (1966).
139. Daigo K., Reed L. J., J. Amer. Chem. Soc., 84, 659 (1962).
140. Heinert D., Martell A. E., J. Amer. Chem. Soc., 85, 183 (1963).
141. Heinert D., Martell A. E., J. Amer. Chem. Soc., 84, 3257 (1962).
142. Dudek G. O., Dudek E. P., Chem. Commun., 1965, 464.
143. Martell A. E., in «Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis» (E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, and A. Rosi Fanelli eds.), Pergamon Press, New York, 1963, p. 13.
144. Thanassi J. W., Butler A. R., Bruice T. C., Biochemistry, 4, 1463 (1965); Auld D. S., Bruice T. C., J. Amer. Chem. Soc., 89, 2083 (1967); 89, 2090 (1967); 89, 2098 (1967).
145. Metzler D. E., J. Amer. Chem. Soc., 79, 485 (1957).
146. Harris S. A., Webb T. J., Folkers K., J. Amer. Chem. Soc., 62, 3198 (1940); Metzler D. E., Snell E. E., *ibid.*, 77, 2431 (1955).
147. Snell E. E., Vitamins and Hormones 16, 77 (1958); Braunstein A. E., in «The Enzymes» (P. D. Boyer, Lardy H. and K. Myrback, eds.), 2d ed., vol. II, Academic Press, Inc., New York, 1960, p. 113.
148. Banks B. E. C., Diamantis A. A., Vernon C. A., J. Chem. Soc., 1961, 4235.
149. Bruice T. C., Topping R. M., J. Amer. Chem. Soc., 85, 1480 (1963); 85, 1488 (1963).
150. Thanassi J. W., Fruton J. S., Biochemistry, 1, 975 (1962).
151. Matthew M., Neuberger A., Biochem. J., 87, 601 (1963).
152. Schirch L., Slotter R. A., Biochemistry, 5, 3175 (1966).
153. Maley J. R., Bruice T. C., J. Amer. Chem. Soc., 90, 2843 (1968).
154. Schirch L., Jenkins W. T., J. Biol. Chem., 239, 3801 (1964); Jenkins W. T., D'Art L., *ibid.*, 241, 2845 (1966); Morino Y., Snell E. E., *ibid.*, 242, 2800 (1967).
155. Novogrodsky A., Nishimura J. S., Meister A., J. Biol. Chem., 238, PC 1903 (1963); 239, 879 (1964).
156. Schirch L., Jenkins W. T., J. Biol. Chem., 239, 3797 (1964).

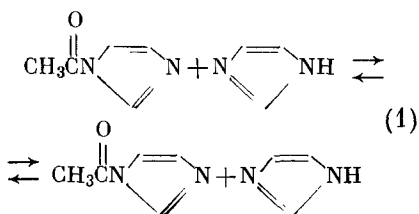
157. Aaslestad H. G., Larson A. D., J. Bacteriol., 88, 1296 (1964); Bailey G. B., Dempsey W. B., Biochemistry, 6, 1526 (1967).
158. Kalyankar G. D., Snell E. E., Biochemistry, 1, 594 (1962).
159. Dunathan H. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 55, 712 (1966).
160. Lecher H. Z., Hardy W. B., J. Amer. Chem. Soc., 70, 3789 (1948).
161. De la Mare P. B. D., Ridd J. H., Aromatic Substitution, Academic Press, Inc., New York, 1959, p. 116.
162. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Amer. Chem. Soc., 86 1410 (1964).
163. Smith T. A., Cordelle F. H., Abeles R. H., Arch. Biochem. Biophys., 120, 724 (1967).
164. Hodgins D. S., Abeles R. H., J. Biol. Chem., 242, 5158 (1967).
165. Peterkofsky A., J. Biol. Chem., 237, 787 (1962).
166. Emmons W. D., J. Am. Chem. Soc., 76, 3468, 3470 (1954); Emmons W. D., Pagano A. S., Freeman J. P., *ibid.*, p. 3472.
167. Lindberg M., Yuan C., De Waard A., Bloch K., Biochemistry, 1, 182 (1962).
168. Kaplan M. M., Flavin M., J. Biol. Chem., 241, 5781 (1966); Giovanelli J., Mudd S. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 366 (1966).
169. Wilson D. B., Hogness D. S., J. Biol. Chem., 239, 2469 (1964).
170. Chen I. W., Charalampous F. C. J. Biol. Chem., 241, 2199 (1966); Eisenberg F., Jr., *ibid.*, 242, 1375 (1967); Chen I. W., Charalampous F. C., Biochem. Biophys. Acta, 136, 568 (1967).
171. Srinivasan P. R., Rothschild J., Sprinson D. B., J. Biol. Chem., 238, 3176 (1963).
172. Elbein A. D., Heath E. C., J. Biol. Chem., 240, 1926 (1965); Matsuhashi S., Matsuhashi, Brown, J. G., Strominger J. L., *ibid.*, 241, 4283 (1966); Hey A. E., Elbein A. D., *ibid.*, p. 5473; Nikaido H., Nikaido K., *ibid.*, p. 1376; Gilbert J. M., Matsuhashi M., Strominger J., J. Biol. Chem., 240, 1305 (1965).
173. Gabriel O., Lindquist L. C., J. Biol. Chem., 243, 1479 (1968); Melo A., Elliott W. H., Glaser L., *ibid.*, p. 1467.
174. Barker I. R. L., Overend W. G., Rees C. W., J. Chem. Soc., 1964, 3254, 3263.
175. Craig J. C., Horning E. C., J. Org. Chem., 25, 2098 (1960).
176. Lachman A., J. Am. Chem. Soc., 45, 2356 (1923).
177. Child W. C., Adkins H., J. Am. Chem. Soc., 45, 3013 (1923); 47, 798 (1925).
178. Eitel A., Lock G., Monatsch. Chem., 72, 392 (1939).
179. Ogata Y., Kawasaki A., Kishi I., Tetrahedron, 23, 825 (1967).
180. Abeles R. H., Lee H. A., Jr., J. Biol. Chem., 235, 1499 (1960).
181. Racker E., Klybas V., Schramm M., J. Biol. Chem., 234, 2510 (1959).
182. Franzen V., Ber., 89, 1020 (1956); Rose I. A., Biochim. Biophys. Acta, 25, 214 (1957); Doering W. E., Taylor T. I., Schoenewaldt E. F., J. Am. Chem. Soc., 70, 455 (1948).
183. Cliffe E. E., Waley S. G., Biochem. J., 79, 475 (1961).
184. Franzen V., Ber., 88, 1361 (1955); 90, 623 (1957).
185. Mitchell P., Biol. Rev., 41, 445 (1966).
186. Wieland T., Lambert R., Ber., 89, 2476 (1956); Akerfeldt S., Acta Chem. Scand., 14, 1980 (1960).
187. Brown D. M., Hamer N. K., J. Chem. Soc., 1964, 326.
188. Clark V. M., Kirby G. W., Todd A., Nature, 181, 1650 (1958); Wieland T., Pattermann F., Angew. Chem., 70, 313 (1958).
189. Clark V. M., Hutchinson D. W., Kirby G. W., Todd A., J. Chem. Soc., 1961, 715; Clark V. M., Hutchinson D. W., Todd A., *ibid.*, p. 722.
190. Cohen J. S., Lapidot A., J. Chem. Soc., 1967C, 1210.
191. Lapidot A., Samuel D., Biochim. Biophys. Acta, 65, 164 (1962).
192. Duckheimer W., Cohen R. A., Biochemistry, 3, 1948 (1964).
193. Blackburn G. M., Cohen J. S., Lord Todd, J. Chem. Soc., 1966C, 239.
194. Peck H. D., Jr., Deacon T. E., Davidson J. T. Biochim. Biophys. Acta, 96, 429 (1965).

ОБЩИЙ КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ КАТАЛИЗ*

А. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ

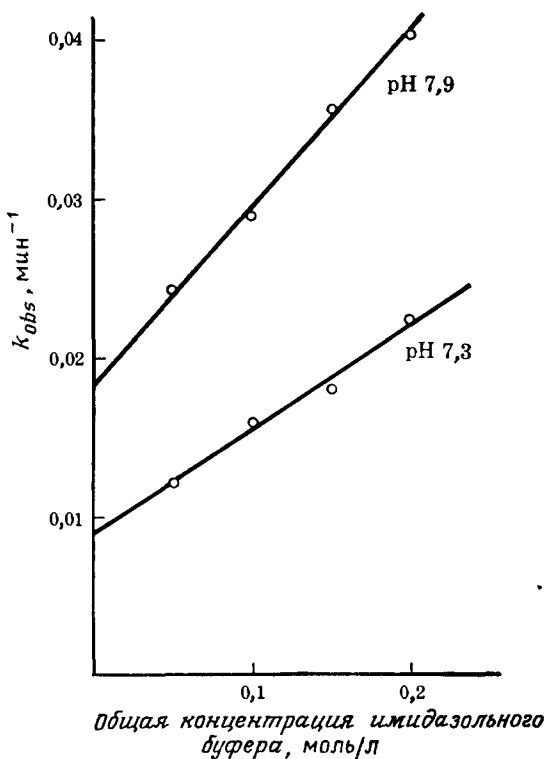
1. ГИДРОЛИЗ АЦЕТИЛИМИДАЗОЛА

Многие из нас были воспитаны на убеждении, что скорость реакции, катализируемой кислотой или основанием, не должна зависеть от концентрации буфера, поскольку концентрации ионов водорода и гидроксидов существенно не меняются при изменении концентрации буфера. Обнаружение того, что это не всегда так, явилось поэтому большой неожиданностью. Например, скорость гидролиза ацетилимидазола возрастает с увеличением концентрации имидазольного буфера (рис. 1) [2]. Поскольку с изменением концентрации буфера pH не меняется, это значит, что непосредственно компонент буфера (либо имидазол, либо ион имидазолия) ускоряет реакцию. Тот факт, что катализ увеличивается при возрастании pH, позволяет предположить, что сам имидазол в форме свободного основания является эффективным катализатором. Увеличение скорости гидролиза не могло быть вызвано нуклеофильной атакой имидазола, поскольку такая нуклеофильная реакция приведет только к регенерации ацетилимидазола и не вызовет превращения, которое можно было бы наблюдать в отсутствие изотопной метки [схема (1)]**.



Поэтому должен быть предложен другой механизм катализа.

Схемы двух типов основного катализа, которые наблюдаются экспериментально, приведены на рис. 2. Если катализ вызывается только ионом

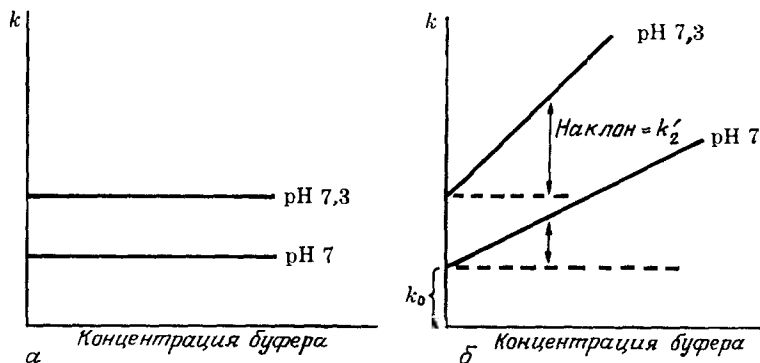


Р и с. 1. Катализ гидролиза ацетилимидазола имидазольным буфером при 25 °С; ионная сила 1,0 М поддерживается хлоридом калия.

* Для более детального изучения см. [1].

** Механизм, по которому имидазол присоединяется к ацетилимидазолу с образованием тетраэдрического промежуточного продукта присоединения, после чего следует S_N2-замещение имидазола водой, маловероятен, поскольку почти всегда такие продукты присоединения менее реакционноспособны по отношению к нуклеофильной атаке, чем ненасыщенные соединения, из которых они образовались [2].

гидроксила, скорость реакции определяется только значением рН и не зависит от концентрации буфера (рис. 2, а). Это случай *специфического основного катализа*. Реакции такого рода включают в качестве реагирующего агента либо непосредственно ион гидроксила, либо одним из реагентов



Р и с. 2.

а — Отсутствие зависимости скорости от концентрации буфера в случае специфического основного катализа; б — зависимость скорости от концентрации буфера при постоянном значении рН для реакции, катализируемой по механизму общесосновного катализа.

является сопряженное основание, которое образуется в количестве, пропорциональном концентрации ионов гидроксила в быстрой равновесной стадии, предшествующей скорости определяющей стадии. В других реакциях,

аналогичных гидролизу ацетилимидазола, наблюдается увеличение скорости с увеличением концентрации буфера при постоянных рН и ионной силе, и это увеличение тем больше, чем больше в буфере основного компонента (рис. 2, б). Так как концентрация ионов гидроксила не изменяется с увеличением концентрации буфера, то это значит, что сам буфер (в данном случае основной компонент буфера) катализирует реакцию. Это случай *общесосновного катализа*, т. е. катализ основаниями, отличными от гидроксильного иона. Пересечение линий на рис. 2, б с осью ординат при нулевой концентрации буфера отражает вклад катализа растворителем и ионом гидроксила (k_0), а тангенс угла наклона прямой дает кажущуюся константу скорости реакции, катализируемой буфером (k'_2).

Зависимость, по которой происходит изменение наклона при изменении состава буфера, показывает, какие компоненты буфера — основные, кислотные или те и другие — являются активными при катализе. На рис. 3 нижняя прямая показывает, как изменяется с изменением состава буфера кажущаяся константа скорости второго порядка k'_2 для катализа имидазолом гидролиза ацетилимидазола.

Р и с. 3. Зависимость кажущейся каталитической константы скорости катализа буфером k'_2 от состава буфера.

Нижняя линия: катализируемый имидазолом гидролиз ацетилимидазола демонстрирует катализ основным компонентом буфера [2]. Верхняя линия: поведение реакции, в которой осуществляется катализ как основным (k_B), так и кислотным k_{BH^+} компонентами буфера.

Пересечение прямой с правой ординатой при концентрации, равной 1, дает константу скорости k_B для катализа основным компонентом буфера, а пересече-

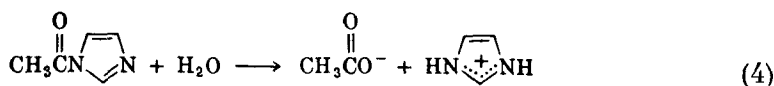
чение с левой ординатой происходит в нулевой точке *. Верхняя линия соответствует реакции, в которой осуществляются *общеосновной* и *общекислотный катализ* компонентами буфера. Аналогично пересечение прямой с правой ординатой дает каталитическую константу *общеосновного катализа*, но так как скорость катализируемой реакции не стремится к нулю при уменьшении доли основания в буфере, то следует заключить, что и кислотные частицы буфера также являются активными катализаторами; пересечение прямой с левой ординатой дает константу *общекислотного катализа* k_{BH^+} . Полное выражение наблюдаемой константы скорости первого порядка в случае такой катализируемой реакции имеет вид

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{sol}} + k_{\text{H}^+}[\text{H}^+] + k_{\text{OH}^-}[\text{OH}^-] + k_{\text{BH}^+}[\text{BH}^+] + k_{\text{B}}[\text{B}] \quad (2)$$

и содержит члены, описывающие как катализ растворителем, ионами гидроксила и водорода, так и катализ компонентами буферной системы. Первые три члена этого уравнения могут отражать общий кислотный или основной катализ, если растворитель, ион водорода и ион гидроксила действуют как общие кислоты или основания. В этом случае уравнение (2) можно записать в более компактном виде

$$k_{\text{obs}} = \sum_i k_{\text{BH}_i^+}[\text{BH}_i^+] + \sum_j k_{\text{B}_j}[\text{B}_j] \quad (3)$$

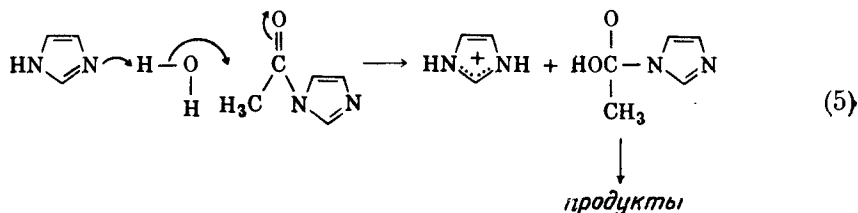
Перенос протона в химических и биохимических реакциях часто имеет решающее значение, но не всегда оценивается по достоинству. Рассмотрим гидролиз ацилсоединений, таких, как ацетилимидазол, при нейтральных значениях pH [схема (4)]. Для того чтобы эта реакция могла осуществиться, первое требование заключается в том, чтобы связь углерод — зота



разрушилась и образовалась новая связь углерод — кислород. Второе требование, которое имеет равное или даже большее значение, заключается в том, чтобы два протона, принадлежащих молекуле воды, были удалены от нее и присоединены (один или оба одновременно) к молекуле имидазола в какой-то момент реакции. Промотирование этого переноса протонов является самым важным механизмом, при котором можно увеличить скорость таких реакций в химической системе, и он, почти наверное, — один из важнейших механизмов в ферментативном катализе. Стадии переноса протона сами по себе имеют малый энергетический барьер, но они могут быть причиной большого энергетического барьера для протекания реакции в целом, если переходное состояние требует образования нестабильных промежуточных соединений, таких, как сопряженные кислоты или основания участвующих в реакции веществ. Химика обычно не слишком беспокоит этот энергетический барьер, так как не трудно добавить к реагирующей смеси ионы гидроксила или водорода и таким путем форсировать перенос протона. Однако для ферментов такой путь невозможен. Не существует очевидного способа, по которому фермент при нейтральных значениях pH мог бы увеличить активность ионов водорода или гидроксила в своем активном центре, поэтому при ферментативных процессах важно иметь возможность избежать образования слишком кислых или слишком основных промежуточных соединений. Большое значение *общекислотного* или *общеосновного катализа* для механизма действия ферментов заключается в том, что таким образом обеспечивается достижение того же конечного резуль-

* В работе [4] было показано, однако, что гидролиз некоторых ацилимидазолов в незначительной степени подвергается *общекислотному катализу* ионом имидазолия.

тата, что и с участием ионов водорода или гидроксила, но без образования нестабильных в растворе сильнокислых или сильноосновных промежуточных частиц. Один из возможных механизмов, который может осуществляться в катализируемом имидазолом гидролизе ацетилимидазола, представлен схемой (5).

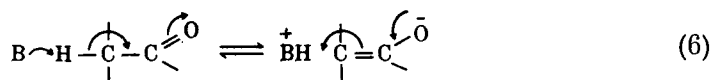


В соответствии с этим механизмом общесредовой катализатор удаляет протон из атакующей молекулы воды, увеличивая тем самым ее нуклеофильную способность без образования свободных ионов гидроксила.

Помимо имидазола и его сопряженной кислоты, в боковых цепях аминокислот и коферментов имеется целый набор групп, таких, как карбоксильная, сульфгидрильная, аммонийная, фенольная, которые являются эффективными общекислотными и общесредовыми катализаторами и которые, как известно, содержатся в активных центрах ферментов. К сожалению, общий кислотно-основной катализ — это тема, о которой проще размышлять, чем проводить четкие эксперименты. Известно всего лишь несколько ферментативных реакций, в механизме которых было доказано участие общесредового или общекислотного катализа. Несколько больше описано реакций, для которых существуют косвенные доказательства такого катализа, и для огромного числа реакций общий кислотно-основной катализ предполагается без соответствующих доказательств, поскольку он является разумным и привлекательным путем увеличения скорости реакции.

2. ДРУГИЕ ПРИМЕРЫ

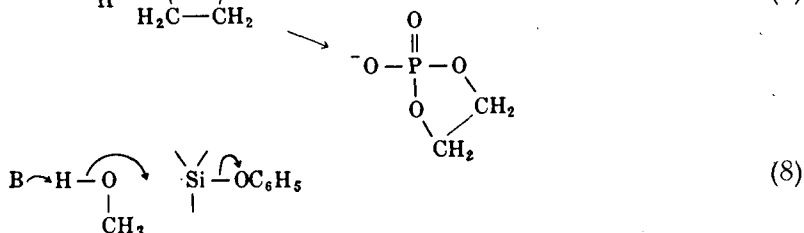
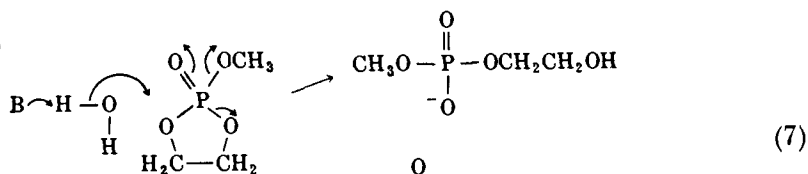
Общий основной и кислотный катализ как в химических, так и в ферментативных системах лучше всего изучен для реакций, в которых перенос протона — наиболее важный процесс, происходящий в переходном состоянии. Большинство таких реакций включает перенос протона от атома или к атому углерода и имеет весьма высокие энергии активации, что определяет энергетический барьер реакции в целом. Классическим примером такого катализа является енолизация кетона [схема (6)]. Общий кислотно-



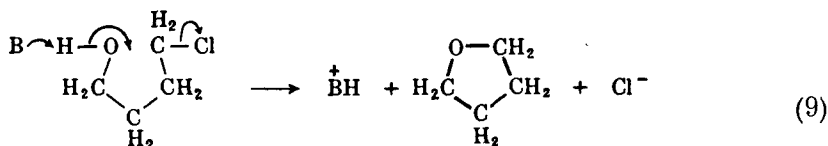
основной катализ реакций такого типа нужно четко отличать от катализа реакций с участием ацильной и карбонильной групп, таких, как гидролиз ацетилимидазола, в котором перенос протона не связан с основным энергетическим барьером реакции. В этих реакциях катализатор облегчает протекание реакции посредством удаления протона от атакующей группы или путем присоединения протона к карбонильной или уходящей группе, и основной энергетический барьер такой реакции обеспечивается образованием или разрушением связей тяжелых атомов с углеродом, а не переносом протона *.

* Это заключение настолько умозрительно, что его нельзя принять без существенных оговорок. В том же процессе (5) распад промежуточного тетраэдрического аниона протекает по реакции первого порядка, а его образование — по реакции третьего порядка. Поэтому для решения вопроса о скорости определяющей стадии необходимо сравнить

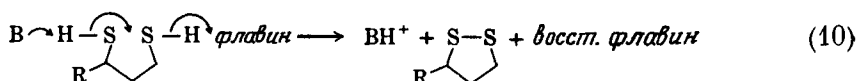
Общий кислотно-основной катализ последнего типа часто наблюдается в реакциях, включающих атаку электрофильного центра, который ненасыщен или представляет собой тяжелый атом с относительно низкоэнергетическими орбиталями. Таким образом, гидролиз реакционноспособного циклического фосфатного триэфира — метилэтиленфосфата [5] и метанолиз арилокситрифенилсиланов [6] подвергаются общему основному катализу, который можно описать механизмами (7) и (8) соответственно.



Для реакций замещения у насыщенного атома углерода общесновной катализ обычно не наблюдается, по-видимому, вследствие того, что эти реакции относительно нечувствительны к основности нуклеофила, так что не происходит сильной стабилизации переходного состояния в результате частичного удаления протона от атакующего нуклеофила. Исключение составляет реакция внутримолекулярного замещения хлора в 4-хлорбутанол с образованием тетрагидрофурана [схема (9)], катализируемая по механизму общесновного катализа боратыми, карбонатными и фенолятыми буферами, так же как ионом гидроксидов и водой [7, 8]. Как было отмечено



[9], необычный тип общеоосновного катализа имеет место при восстановлении рибофлавина дигидролипоевой кислотой. Возможный механизм этой интересной реакции, которая может служить моделью соответствующих ферментативных реакций, представлен схемой (10)



не просто скорости этих двух процессов, так как они всегда одинаковы в условиях стационарного протекания реакции, а их кинетические коэффициенты, имеющие размерность константы скорости первого порядка:

$$a_3 = k_3[\text{имидазол}][\text{H}_2\text{O}] - \text{тримолекулярная реакция,}$$
 $a_1 = k_1$ — мономолекулярная реакция.

Значение k_3 можно оценить равным примерно 1 л/моль·с. Поэтому при [имидазол] $\approx 10^{-2}$ М $a_3 \approx 1$ с $^{-1}$. Таким образом, если лимитирующим является распад тетраэдрического иона, то время его жизни должно быть порядка 5—10 с и более, что чрезвычайно маловероятно. — *Прим. ред.*

Б. СООТНОШЕНИЕ БРЁНСТЕДА

Эффективность общекислотных катализаторов возрастает с увеличением основности, и тангенс угла наклона прямой $\log k_B$ относительно pK_a для серии катализаторов является мерой чувствительности реакции к основности катализатора. Такая зависимость для катализа гидролиза

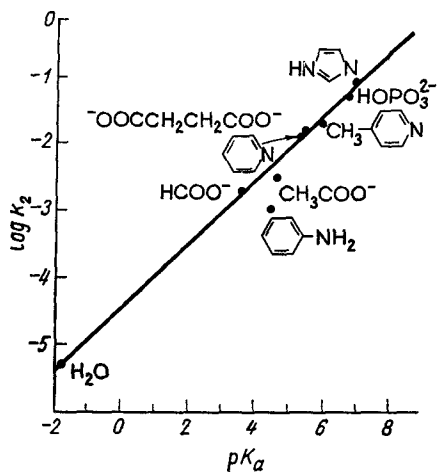


Рис. 4. Зависимость Брёнстеда для каталитических констант общекислотного катализа гидролиза этилдихлорацетата [10].

определять сравнением каталитической активности структурноаналогичных соединений, которые часто дают идеальное совпадение с прямой в большом диапазоне основности.

Логарифмическая зависимость каталитических констант общекислотного катализа относительно pK_a катализаторов дает отрицательный наклон Брёнстеда α , который является мерой чувствительности реакции к кислотности общекислотных катализаторов:

Эти зависимости описываются уравнениями Брёнстеда для общекислотного и общекислотного катализа, где G_A и G_B постоянны для каждой серии реакций

$$\log k_B = \log G_B + \beta (pK_a). \quad (11)$$

$$\log k_{HA} = \log G_A - \alpha (pK_a). \quad (12)$$

Линию, проведенную через точки, соответствующие константам скорости, кислородсодержащих оснований на рис. 4, можно экстраполировать до точки, соответствующей константе скорости реакции этилдихлорацетата с водой. Эта экстраполяция заслуживает специального обсуждения. Во-первых, чтобы сравнение было верным, как константа скорости, так и константа кислотности для реакций, катализируемых водой, должны быть выражены в единицах, использованных для других катализаторов. Необходимо внести поправку вследствие того, что стандартная активность или концентрация чистой воды должна быть принята равной 1,0, а не 55,5 М. Поэтому наблюдаемая константа скорости для независимой от pH катализируемой водой реакции [k_{sol} в уравнении (2)] должна быть поделена при сравнении с другими каталитическими константами на 55,5 М. По той же причине pK сольватированного протона принимается равным $-1,74$ вместо 0, поскольку необходимо учесть, что концентрация воды — сопряженного основания этой кислоты — 55,5, а не 1,0 М, как для стандартных состояний сопряжен-

ных оснований других кислот. Рассмотрим кислоту HA с $\text{pK} = 0$ с тем же самым формальным pK , что и у сольватированного протона, и примем, что диссоциация кислоты происходит в соответствии с уравнением (13), так что в стандартном состоянии при $\text{pH} 0$ одинаковые количества воды и кислоты существуют в протонированной форме



Такая кислота фактически много слабее, чем сольватированный протон потому что кислота существует наполовину в протонированной форме в условиях, в которых протонируется только $\frac{1}{55}$ доля воды. Значение pK для кислотной диссоциации воды до гидроксильного иона берется при 25°C равным 15,74, а не 14, так как ионное произведение воды 10^{-14} также основано на стандартной активности 1,0 для чистой воды [уравнение (14)]

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}, \quad (14)$$

и эта константа диссоциации должна быть выражена для сравнения с другими кислотами в соответствии с тем же условием [уравнение (15)]

$$K_{\text{нон}} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} = \frac{K_w}{[\text{H}_2\text{O}]} = \frac{10^{-14}}{55,5} = 10^{-15,74}. \quad (15)$$

Удовлетворительное соответствие точки для воды на линейной зависимости Брэнстеда (рис. 4) показывает, что поведение воды аналогично поведению любого другого катализатора, т. е. реакция воды представляет собой общеоосновной катализ растворяющей водой. С другой стороны, для более основных нуклеофилов, таких, как аммиак, трис-(оксиметил)-аминометан и ион гидроксила, наблюдается положительное отклонение от зависимости Брэнстеда для общеоосновного катализа гидролиза этилдихлорацетата и родственных ему эфиров. В случае этих азотсодержащих нуклеофилов продукт реакции представляет собой ацилированный нуклеофил (в противоположность менее основному анилину, который увеличивает скорость расхода эфира по механизму общеоосновного катализа гидролиза без образования анилида). Таким образом, сильно основные нуклеофилы, способные к замещению алкоксидной уходящей группы, реагируют по механизму нуклеофильной атаки, а не общеоосновного катализа, и поэтому для них характерно положительное отклонение от зависимости Брэнстеда для общего основного катализа. Положительное отклонение для иона гидроксила, которое составляет почти два порядка для реакции этилдихлорацетата, позволяет полагать, что эта реакция включает непосредственную нуклеофильную атаку эфира ионом гидроксила, а не атаку воды, катализируемую ионом гидроксила. Отклонения такого рода не являются необычными для нуклеофильных реакций. Наличие таких отклонений указывает на то, что атака сопряженного основания нуклеофила — процесс, отличающийся от катализируемой ионом гидроксила атаки самого нуклеофила, и что реакция, катализируемая по специфическому основному механизму, может конкурировать с процессом, катализируемым по общеоосновному механизму.

Специфические свойства воды, сольватированного протона и иона гидроксила, обусловленные тем, что они являются компонентами растворителя, и трудности в подыскании кислот и оснований, пригодных для сопоставлений, приводят к тому, что иногда сложно получить количественные корреляции реакционной способности этих соединений. Эти катализаторы часто проявляют хорошее соответствие с зависимостью Брэнстеда, построенной для других типов катализаторов, но во многих случаях они выпадают из этой зависимости по причинам, которые еще твердо не установлены.

1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПОПРАВКИ

Константы скорости для общего кислотно-основного катализа обычно исправляют на статистические эффекты, которые являются следствием того, что в некоторых кислотах и основаниях существует больше одного центра, способного отдать или принять протон [3, 11]. Модифицированные выражения Брэнстеда даются уравнениями (16) и (17):

$$\log \frac{k_{HA}}{p} = \log G_A - \alpha \left(pK_a + \log \frac{p}{q} \right), \quad (16)$$

$$\log \frac{k_B}{q} = \log G_B + \beta \left(pK_a + \log \frac{p}{q} \right), \quad (17)$$

где p — число эквивалентных протонов, которые могут быть перенесены от кислоты, и q — число центров, которые могут принять протон основания. Статистические поправки почти всегда делают для таких соединений, как дикарбоновые кислоты. Общеизвестно также, что статистическую поправку необходимо делать для соединений, таких, как ион аммония, у которого один центр может служить поставщиком нескольких протонов. Однако большинство констант скоростей в литературе дано без учета такой возможности. В настоящее время нет определенного взгляда на поправку, которая должна быть сделана для сольватированного протона, прочно связанного с одной молекулой воды в виде иона H_3O^+ , дополнительно окруженного еще тремя молекулами воды с образованием в целом частицы $H_9O_4^+$. Никаких поправок обычно не делают для атомов, имеющих несколько электронных пар, каждая из которых может акцептировать протон, таких, например, как анион кислорода. Статистические поправки обычно невелики, и эта проблема не имеет фундаментального значения для механизма кислотно-основного катализа. Данные, приведенные на рис. 4, не были исправлены на статистические эффекты, но даже если их ввести, то общее соответствие точек прямой существенно не изменится.

Возможность обнаружить общий кислотный или основной катализ экспериментально зависит от значения наклона прямой Брэнстеда α или β , а также от силы и концентрации кислоты или основания. Тот факт, что экспериментально наблюдается, например, общий кислотный катализ, означает, что слабая кислота, функционирующая как катализатор, стабилизирует переходное состояние лучше, чем сольватированный протон, несмотря на то что сольватированный протон — значительно более сильная кислота. Иными словами, относительно низкая каталитическая способность слабой кислоты более чем компенсируется тем, что ее концентрация может быть много больше, чем концентрация сольватированного протона при данном значении pH. Качественно это значит, что общий кислотный катализ нельзя обнаружить, если наклон брэнстедовской зависимости α равен 1,0, поскольку если α будет иметь это значение, то это будет соответствовать такой большой каталитической эффективности сольватированного протона, которая компенсирует его низкую концентрацию, и катализ другими кислотами будет трудно или невозможно обнаружить. Аналогично, если $\alpha = 0$, теряется чувствительность к кислотным свойствам катализатора, в результате чего катализ добавленными кислотами невозможно обнаружить, поскольку реакция будет максимально катализироваться растворителем, присутствующим в более высокой концентрации, чем любой добавленный катализатор.

Эту ситуацию лучше всего проиллюстрировать числовым примером. В табл. 1 приведены вычисленные Беллом доли общей скорости реакции, вызываемой катализом сольватированным протоном, водой и уксусной кислотой в присутствии буфера (0,1 М уксусной кислоты — 0,1 М ацетата натрия) при α , равном 0,1; 0,5 и 1,0 [12]. Видно, что общекислотный катализ

Таблица 1

Обнаружение общекислотного катализа
в присутствии буфера 0,1 М уксусной
кислоты — 0,1 М ацетата натрия [12]

Значение α по Брэнстеду	Доля скорости реакции, вызываемая катализом, %		
	H ⁺	CH ₃ COOH	H ₂ O
0,1	0,002	2	98
0,5	3,6	96,4	0,01
1,0	99,8	0,2	$5 \cdot 10^{-12}$

уксусной кислотой будет заметным только при промежуточных значениях α . Те же рассуждения справедливы в отношении значения β для осноосновного катализа. Реакция образования и разложения продукта присоединения перекиси водорода к *n*-хлорбензальдегиду обнаруживает чувствительность к общекислотному катализу карбоновыми кислотами, несмотря на то что α для этой реакции равно или очень близко к 1,0. Общекислотный катализ становится заметным для этой реакции вследствие того, что точка, соответствующая константе скорости катализа протоном, лежит значительно ниже линейной зависимости Брэнстеда для карбоновых кислот [13]. Иногда обсуждается вопрос, существует ли принципиальное различие между специфически кислотно катализируемой реакцией и общекислотно катализируемой реакцией со значением $\alpha = 1,0$. То, что общекислотный катализ кислотами, отличными от сольватированного протона, можно наблюдать при $\alpha = 1,0$, означает, что такое различие существует, хотя на практике обнаружить его трудно.

2. ОТКЛОНЕНИЯ ОТ СООТНОШЕНИЯ БРЭНСТЕДА

Для некоторых классов катализаторов могут наблюдаться большие отклонения от прямой Брэнстеда, установленной для другого класса катализаторов. Некоторые примеры таких отклонений для общекислотного катализа гидратации ацетальдегида приведены в табл. 2 [14]. Константы

Таблица 2

Отклонения от зависимости Брэнстеда для общекислотного,
катализа дегидратации гидрата ацетальдегида [14]

	Логарифми- ческое отклонение		Логарифми- ческое отклонение
Нитрометан	-1,4	Ацетоксим	+2,1
Нитроэтан	-1,7	Оксим ацетофено- на	+1,4
Димедон (1,3-ди- кето-5-диметил- циклогексан)	-1,1	Оксим бензофено- на	+1,2
Бензоилацетат	-1,4		

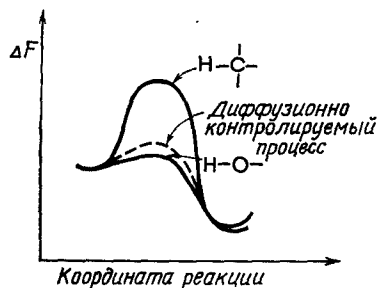
скоростей для кислот, в которых протон связан с атомом углерода, при сравнении с прямой, основанной на каталитической эффективности карбоновых кислот, фенолов и некоторых других кислот, обнаруживают 10—100-кратные отрицательные отклонения, в то время как оксимы обнаруживают такие же положительные отклонения.

Имеет смысл рассмотреть возможные объяснения таких отклонений, поскольку часто именно такие «неправильности» открывают путь к пониманию механизма явления. Соотношение Брэнстеда сравнивает свободную энергию равновесия для полного переноса протона со свободной энергией образования переходного состояния, включающего лишь частичный перенос протона [уравнение (18) и (19)]:



Отклонения от соотношения Брэнстеда означают, что различные эффекты, которые оказывают влияние на эти свободные энергии, влияют на них не в одинаковой степени, т. е. влияние некоторого фактора может быть «ненормальным» либо на pK катализатора, либо на переходное состояние реакции.

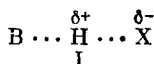
Объяснение отрицательного отклонения, которое проявляют кислоты типа нитрометана (карбокислоты), непосредственно следует из того экспериментального факта, что скорость переноса протона от атома углерода сравнительно мала, в то время как скорость переноса протона от кислорода, азота или серы в кислотах в термодинамически благоприятном направлении, вообще говоря, лимитируется только скоростью диффузии, так что скорость самого процесса переноса протона должна быть даже выше, чем диффузионно контролируемая скорость. Схематически такая ситуация приведена на рис. 5. Так как активационный энергетический барьер для переноса протона от карбокислот значительно выше, чем для переноса протона



Р и с. 5. Энергетический барьер для переноса протона, связанного с углеродом, много выше, чем для протона, связанного с кислородом. В последнем случае величина барьера точно равна диффузионному барьеру, так что барьер для самого процесса переноса протона даже меньше, чем энергетический барьер для диффузии.

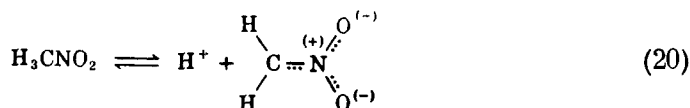
от других кислот, то в активированном комплексе энергия карбокислоты будет менее благоприятна при любой промежуточной степени переноса протона, чем энергия кислородсодержащей кислоты соизмеримой кислотности. Следовательно, энергия переходного состояния для катализа карбокислотой должна быть выше, чем энергия для катализа кислородсодержащей кислотой, поскольку общий кислотный катализ включает частичный перенос протона к субстрату.

Было предложено несколько объяснений медленного процесса переноса протона и неэффективности карбокислот в общем кислотно-основном катализе [14-17]. Водород-углеродная связь имеет более ковалентный характер, чем связи между водородом и более электроотрицательными элементами, так что медленный перенос протона может быть следствием того факта, что ковалентные связи, как правило, труднее разрушить, чем электростатические. Второе объяснение заключается в том, что водородные связи (с участием атома водорода связи $C-H$) малостабильны, главным образом из-за низкой электроотрицательности углерода, вследствие чего трудно образовывать переходные состояния с протоном, удаленным от углерода, в которых водородная связь обеспечивала бы стабилизирующее влияние (I).



Третье объяснение исходит из того факта, что стабильность большинства карбокислот, таких, как нитрометан, становится возможной вследствие

резонансной стабилизации образующегося аниона, большая часть отрицательного заряда в котором локализована на электроотрицательном атоме, а не на углероде [схема (20)]

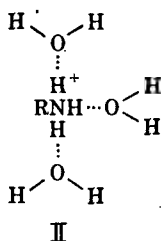


Обеспечение этого резонанса требует существенной перестройки структуры и заряда как в ионизирующей кислоте, так и в окружающих молекулах растворителя, в результате чего возникает большой энергетический барьер для удаления протона. Подтверждением этого объяснения служит тот факт, что ион гидроксила удаляет протон приблизительно в 100 раз быстрее от фенилацетилена, который претерпевает при ионизации небольшую перестройку, чем от нитроэтана, несмотря на то что фенилацетилен как кислота в 10^{11} раз слабее, чем нитроэтан [17].

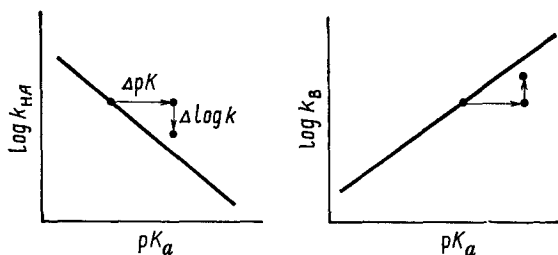
Ненормально высокую реакционную способность оксимов в качестве общекислотных катализаторов объясняли склонностью их молекул к легкой структурной реорганизации, сопровождающей ионизацию этих соединений до аниона, большая часть отрицательного заряда которого сосредоточена на одном атоме кислорода [15]. Однако это объяснение, по-видимому, не является общим. Разные классы кислот обнаруживают различную относительную эффективность в разнообразных типах реакций, и отклонения, которые следует ожидать для кислородных кислот, имеющих большие возможности для резонансной стабилизации своих сопряженных оснований, таких, как нитрофенолы, не обнаруживают какой-либо тенденции к закономерности [14, 18].

Различия в сольватации кислот, оснований и активированных комплексов, несомненно, — важные причины отклонений от соотношения Брэнстеда, но направление таких отклонений зависит от относительной сольватации реагентов и активированного комплекса, что требует особой осторожности в анализе суммарного действия этих эффектов. Наиболее тривиальный путь выявления сольватационных эффектов заключается в сравнении эффективности катализаторов, действующих в одном растворителе, с кислотностями или основностями, измеренными в другом растворителе (обычно в воде). Если кислотности различных катализаторов изменяются в разной степени при изменении растворителя, то, конечно, будут наблюдаться отклонения от соотношения Брэнстеда. Эту трудность легко предотвратить, если использовать для измерения скоростей и кислотностей один и тот же растворитель.

Существует большое число свидетельств в пользу того, что аммонийные ионы стабилизируются за счет взаимодействия их атомов водорода с водой (II), так что их реальная кислотность меньше той, которая должна бы наблюдаться в отсутствие такой стабилизации [1, 19—21]. С этим согласуется тот удивительный факт, что ион метоксиаммония ($\text{p}K_a$ 4,7) в качестве кислоты в 20 раз сильнее, чем ион гидроксиламмония ($\text{p}K_a$ 6,0). Причиной, по-видимому, является то, что последний сильно стабилизирован за счет сольватации гидроксильной группы. Аналогичные эффекты, наблюдающиеся



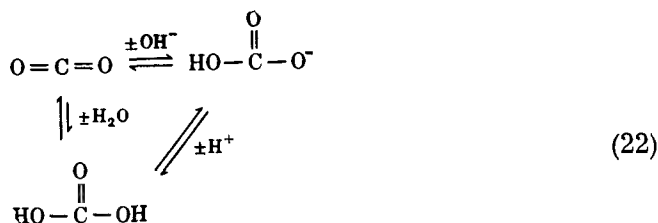
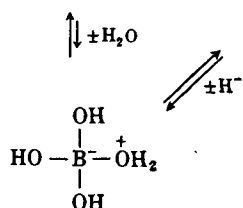
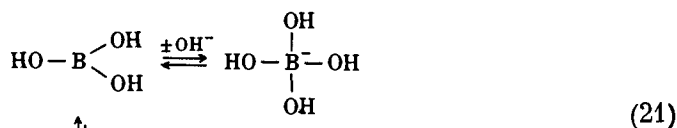
при сравнении гидразина (pK_a 8,1) с N,N-диметилгидразином (pK_a 7,2) и тетраметилгидразином (pK_a 6,3), были использованы для объяснения увеличения, а затем уменьшения основности в следующей серии веществ: аммиак, метиламин, диметиламин, триметиламин. Тот же эффект, по-видимому, в значительной степени ответствен за меньшую основность оксиметиламинов по сравнению с их исходными аминами (что позволяет вести титрование аминов формальдегидом), так как оксиметильная группа имеет меньшую индуктивную электроноакцепторную способность по сравнению с водородом [21]. Поэтому эффективность аммонийных ионов и аминов в качестве общих кислотных и основных катализаторов должна зависеть от степени, с которой



Р и с. 6. Зависимости Брёнстеда для кислотного и основного катализа, показывающие, как фактор, действующий на силу кислоты или основания, такой, как сольватация, может приводить к отклонениям от прямой в случае изменения в различной степени кислотности и каталитической эффективности катализатора.

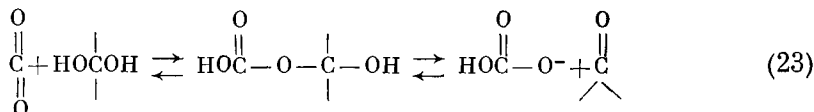
сольватационные эффекты действуют на переходное состояние по сравнению с исходным аммонийным ионом. Как показано на рис. 6, результатом дополнительной стабилизации аммонийного иона вследствие образования водородной связи с растворителем может быть увеличение его pK по сравнению с несольватированным ионом, менее заметное уменьшение его эффективности в качестве кислотного катализатора и увеличение эффективности как основного катализатора. В результате этого в зависимости от величины α или β и от степени сольватации переходного состояния может наблюдаться как положительное, так и отрицательное отклонения от соотношения Брёнстеда. Тот экспериментальный факт, что в реакции разложения нитрамида в воде [22] первичные амины являются менее эффективными катализаторами по сравнению с третичными аминами той же основности, указывает на то, что в переходном состоянии этой реакции происходит относительно низкая сольватация положительного заряда, возникающего на катализаторе.

Природа отклонений от соотношения Брёнстеда для различных классов реакций, катализируемых по механизму общего кислотно-основного катализа, заслуживает более полного и систематического исследования, поскольку анализ этих отклонений может помочь понять такие важные проблемы, как детальная структура переходного состояния, значение «согласованных» каталитических механизмов, энергетическое состояние переносимого протона в переходном состоянии и, наконец, способность окружающих молекул растворителя претерпевать перестройку и обеспечивать сольватацию переходного состояния за время его образования. Катализаторы, ионизация которых подчиняется иному механизму, могут быть особенно полезны в этом отношении, если можно точно оценить факторы, определяющие их каталитическую эффективность. Борная и угольная кислоты, например, претерпевают кислотную ионизацию в преобладающей степени в результате присоединения иона гидроксила, а не потери протона {схемы (21) и (22)} [23]

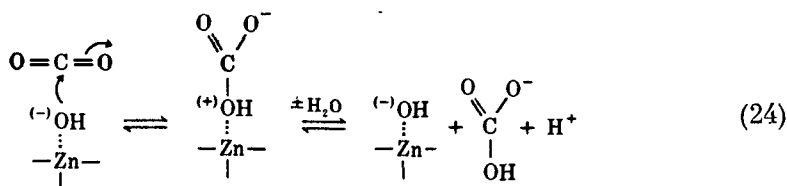


Двуокись углерода в воде гидратируется в очень малой степени, так что кажущееся значение $pK = 6,4$ для диссоциации угольной кислоты на бикарбонат-ион фактически основано на общем содержании угольной кислоты и растворенной двуокиси углерода. Правильное значение pK для диссоциации угольной кислоты равно 3,8. Другими словами, равновесие присоединения протона к бикарбонат-иону смещается дегидратацией образующейся угольной кислоты, в результате чего бикарбонат-ион кажется более сильным основанием, чем он фактически является. Следовало ожидать, что кислоты и основания такого рода всегда будут давать отклонения от прямой Брёнстеда, построенной с использованием кажущихся значений pK , но фактически, по причинам еще недостаточно установленным, эти отклонения наблюдаются в одних реакциях и не наблюдаются в других.

Конечно, необходимо помнить о том, что положительные отклонения от брёнстедовской зависимости для общего кислотно-основного катализа могут быть вызваны наличием в реакции других механизмов катализа, таких, как нуклеофильный или электрофильный катализ. Некоторые примеры такого катализа были описаны в предыдущей главе. Высокая каталитическая активность в реакции гидратации двуокиси углерода, описанная для катализаторов, которые сами способны претерпевать гидратацию и дегидратацию [24], может отражать ковалентный механизм реакции, как показано схемой (23).



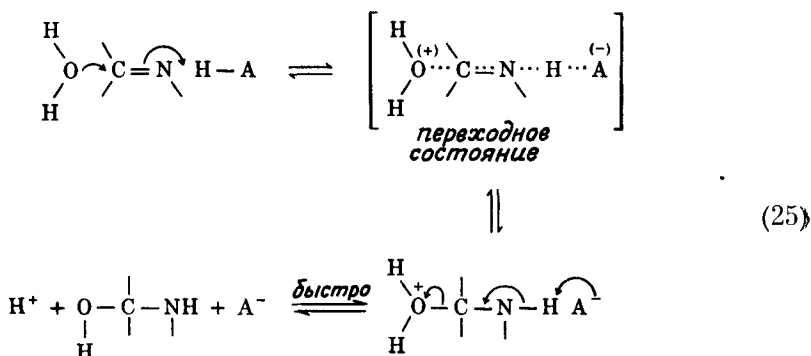
Существуют убедительные свидетельства в пользу механизма такого рода в реакции гидратации двуокиси углерода, катализируемой карбоангидразой, в которой гидратированный ион цинка является каталитически активной частицей {схема (24)} [25]. Значение pK гидратированного иона цинка



лежит вблизи точки нейтральности, и роль катиона металла, по-видимому, заключается в том, что он уменьшает основность иона гидроксила до степени, при которой высокая концентрация нуклеофила может существовать при нейтральных значениях pH, или, наоборот, увеличивает основность воды замещением протона электростатической связью с металлом, вследствие чего атом кислорода становится достаточно основным, чтобы атаковать двуокись углерода (а также и другие карбонильные соединения) с высокой скоростью.

В. ДВУСМЫСЛЕННОСТЬ В УСТАНОВЛЕНИИ ЦЕНТРА КАТАЛИЗА

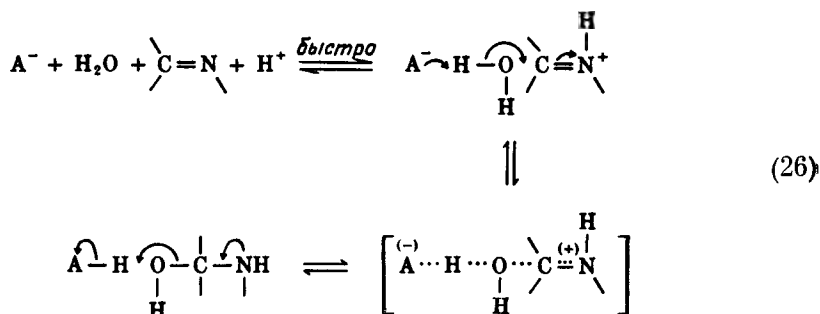
Рассмотрим атаку водой имина (такого, как основание Шиффа или оксим) и обратную реакцию, которая представляет собой дегидратацию продукта присоединения карбиноламина. Эти реакции подвергаются общекислотному катализу, и первая проблема при определении механизма их катализа состоит в том, чтобы установить, на какой центр действует катализатор. Как показано на схеме (25), он может действовать в качестве донора протона для атома азота имина, увеличивая тем самым чувствительность имина к нуклеофильной атаке водой. Затем на быстрой стадии реакции промежуточный продукт должен потерять протон. Необходимо отметить, что механизм прямой реакции определяет и механизм обратной реакции, поскольку как прямая, так и обратная реакции должны идти через одно и то же переходное состояние, которое расположено в точке седловины самого низкого энергетического пути, ведущего от исходных веществ к продуктам реакции и, наоборот, от продуктов к исходным веществам. Это соответствует принципу микроскопической обратимости. В этом случае, следовательно, обратная реакция должна протекать через присоединение протона к атому кислорода карбиноламина за счет быстрой обратимой стадии реакции, после чего следует перенос протона с атома азота на сопряженное основание катализатора A^- , облегчая удаление воды [схема (25)].



В этой и последующих схемах кривые стрелки используют для обозначения образования и разрушения связей как прямой, так и обратной реакции. Можно считать почти правилом тот факт, что если катализатор действует, отдавая протон при протекании прямой реакции, то сопряженное основание этого катализатора должно принимать тот же протон в обратной реакции. Другими словами, реакция, которая подвергается общекислотному катализу в одном направлении, также подвергается специфическому кислотному катализу (быстрый перенос протона на первой равновесной стадии) и общеосновному катализу (под действием A^-) в обратном направлении.

Однако для той же реакции возможен альтернативный механизм, в соответствии с которым протон присоединяется к имину на первой быстрой равно-

весной стадии реакции и сопряженное основание катализатора A^- оттягивает протон от атакующей молекулы воды, делая ее более эффективным нуклеофильным реагентом [схема (26)].



Этот механизм представляет собой специфический кислотный-основной катализ реакции в прямом направлении. В обратном направлении катализатор должен действовать, отдавая протон уходящей гидроксильной группе, с тем чтобы частично придать ей свойства молекулы воды и тем самым увеличить ее способность к удалению. Это и есть непосредственный общекислотный катализ.

Упомянутые два механизма иллюстрируют двусмысленность определения центра катализа в реакции, катализируемой по общекислотному механизму. Подобная двусмысленность существует во всех реакциях такого рода, и ее разрешение представляет собой одну из наиболее важных задач при установлении механизма таких реакций. Та же неопределенность существует при установлении механизмов реакций, катализируемых ферментами, и разрешение ее в этом случае еще более сложно. Рассматриваемая двусмысленность является следствием формальной кинетики, поскольку оба механизма приводят к конечным уравнениям скорости, имеющим одинаковый вид, что легко можно показать алгебраически. Уравнение скорости для реакции (25) имеет вид

$$v = k[H_2O][>C=N-][HA], \quad (27)$$

а для реакции (26)

$$v = k'[H_2O][>C=\overset{+}{N}H][A^-]. \quad (28)$$

Константы равновесия диссоциации общей кислоты и сопряженной кислоты имина даются уравнениями

$$K_{HA} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{и} \quad K_{NH^+} = \frac{[H^+][>C=N-]}{[>C=\overset{+}{N}H]}.$$

Выражая концентрации реагентов уравнения (28) через концентрации сопряженных кислот и оснований и используя эти константы равновесия, получаем уравнение, которое идентично уравнению (27), за тем исключением, что $k = k' K_{HA} / K_{NH^+}$. Таким образом, обе реакции подчиняются одному и тому же закону скорости и неразличимы при использовании обычных кинетиче-

$$v = k' \frac{K_{HA}}{K_{NH^+}} [H_2O][>C=N-][HA]. \quad (29)$$

ских методов. Существует непоколебимый психологический барьер при восприятии этого факта, но твердое понимание его необходимо при обсуждении механизмов химических или ферментативных реакций, в которых двусмысленность такого рода возможна.

Та же двусмысленность существует при рассмотрении общесредного катализа. Реакция, которая кинетически соответствует общесредному катализу, по механизму может представлять собой действительно общесредный катализ, а также кинетически неразличимый специфический основной — общеислотный катализ.

Необходимо отметить, что существует нерешенная семантическая проблема в определении общесредного или общеислотного катализа. Так, выражение «общесредный катализ» может означать следующее:

1) Экспериментальное наблюдение, что скорость реакции ускоряется основаниями, отличающимися от иона гидроксидов. Ускорение может быть вызвано нуклеофильным катализом или катализом переноса протона.

2) Катализ переноса протона буфером со скоростью, пропорциональной концентрации основных частиц буфера в соответствии с уравнением (30):

$$v = k[\text{HS}][\text{B}]. \quad (30)$$

Это может быть действительно общесредным катализом переноса протона, а также комбинацией равновесного удаления протона от субстрата (специфический основной катализ) и общеислотного катализа кислотными частицами буфера. Последняя реакция подчиняется уравнению скорости (31), которое кинетически идентично уравнению (30) при $k = k'K_{\text{HS}}/K_{\text{BH}^+}$:

$$v = k'[\text{S}^-][\text{HB}^+]. \quad (31)$$

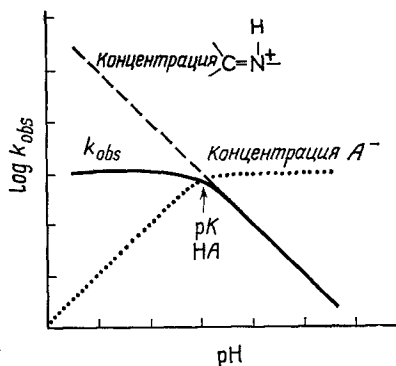
3) Истинный общий катализ, при котором основание включается в переходное состояние и действует путем удаления протона, когда реакция протекает в данном направлении.

В настоящее время нет общепризнанного способа разграничить эти значения, поэтому важно объяснить, что имеется в виду, когда используются эти термины.

По-видимому, следует более детально рассмотреть, почему механизмы (25) и (26) кинетически неразличимы. Допустим, что есть надежда различить эти механизмы при помощи изучения рН-зависимостей скоростей реакций. Для

Рис. 7. Диаграмма, которая показывает, почему зависимости скорости реакции от рН идентичны, если реакция включает общеислотный катализ $>C=N-$ под действием HA или общесредного катализа $>C=NNH^+$ — под действием A^- .

простоты примем, что доля протонированного имина в рассматриваемой области рН мала. В этом случае рН-зависимость реакции по механизму (25) будет иметь вид, представленный в логарифмических координатах на рис. 7. Скорость реакции не будет зависеть от рН в области, в которой катализатор полностью находится в активной форме HA , и будет уменьшаться по мере того, как он будет превращаться в неактивную форму A^- . Причина, по которой реакция (26) будет описываться той же зависимостью от рН, заключается в следующем: в области низких значений рН, в которой скорость реакции (25) не зависит от рН, увеличение рН, например, на единицу увеличит в 10 раз концентрацию активной формы катализатора A^- [рис. 7 (.....)], но в то же время это вызовет 10-кратное уменьшение концентрации активной формы субстрата $>C=NNH^+$ [рис. 7 (----)]. Эти эффекты будут взаимно компенсироваться, вследствие чего наблюдаемая скорость также не будет зависеть от рН. При высоких значениях рН концентрация A^- не будет зависеть от рН, но концентрация $>C=NNH^+$ будет по-прежнему уменьшаться с увеличением рН, и поэтому и наблюдаемая скорость с увеличением



pH будет уменьшаться. Таким образом, pH-зависимость для двух механизмов одинакова. Читатель, чувствующий недостаточную обоснованность такого вывода, может проверить эти соотношения для механизмов обратной реакции. Эти механизмы также не удастся различить, исследуя влияние растворителя, эффекты добавленных солей и используя другие критерии такого же рода. Несмотря на то что влияние таких воздействий на конденсацию различных реагирующих веществ и промежуточных соединений можно предугадать, можно показать аналогично тому, как это сделано при рассмотрении влияния pH, что для данной полярности переходного состояния все различия во влиянии на промежуточные соединения взаимно компенсируются и для обоих механизмов можно предсказать тот же эффект.

Большое преимущество использования представлений о переходном состоянии при обсуждении такого рода вопросов заключается в том, что это существенно упрощает анализ, и правильный ответ можно найти без затруднений. В терминах теории переходного состояния кинетика реакции в значительной мере определяется стехиометрическим составом переходного состояния. Поэтому из кинетических данных можно установить, какие атомы включены в переходное состояние и каков его общий заряд, но это не дает информации о том, как атомы или заряды организованы в переходном состоянии. Обычными кинетическими методами невозможно определить, являются ли соединения, которые находятся в быстро устанавливаемом равновесии с исходными соединениями или продуктами реакции, действительно промежуточными соединениями нормального пути реакции. Можно сразу заметить, что переходные состояния для механизмов (25) и (26) имеют один и тот же стехиометрический состав и заряд, и, следовательно, эти механизмы кинетически неразличимы. Далее, если переходные состояния для реакций (25) или (26) имеют примерно ту же полярность и одинаковое распределение зарядов, то можно сразу считать, что эти механизмы неразличимы по влиянию растворителя или добавленной соли. Любые такие влияния могут изменить разность в энергиях между исходным и переходным состояниями, но эти влияния будут сказываться на стабильности обоих переходных состояний в одинаковой степени и поэтому будут одинаково сказываться на скорости реакции по обоим механизмам.

К счастью, существуют приемы для разрешения этой двусмысленности, по крайней мере в некоторых реакциях. Четыре таких приема заключаются в следующем: а) связывание протона при полном протонировании субстрата либо полное депротонирование субстрата; б) исследование модельного соединения, в котором протон замещается ненабильным заместителем, таким, как метильная группа; в) доказательство того, что обсуждаемый механизм включает промежуточное соединение, которое термодинамически слишком нестабильно, чтобы обеспечить наблюдаемую скорость реакции; г) использование структурнореакционных корреляций. Эти приемы с несколькими примерами их приложения будут рассмотрены далее; другие примеры приведены в гл. 10.

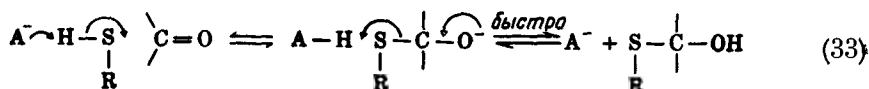
а) *Связывание и удаление протона.* Если атака имина водой изучается при pH, при котором имин уже полностью протонирован, то в этом случае катализатор не может действовать путем передачи протона имину. Если катализ все-таки наблюдается в этих условиях, то он не может протекать в соответствии с механизмом (25), но согласуется с механизмом (26). Необходимо отметить, что катализ в этих условиях описывается уравнением скорости

$$v = k[\text{H}_2\text{O}][>\text{C}=\overset{+}{\text{N}}\text{H}][\text{A}^-], \quad (32)$$

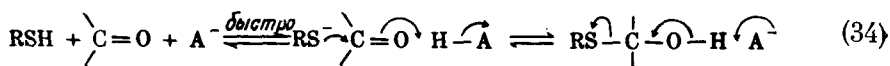
которое отражает катализ сопряженным основанием катализатора. Выше было показано, что этот катализ кинетически аналогичен общекислотному катализу реакции свободного имина [уравнение (28)]. Этот критерий при-

меним и к гидролизу **иминов**, образованных из алифатических аминов, так как такие имины имеют значения pK в области 7 и, таким образом, достаточно основны, чтобы их можно было исследовать при pH , при котором они полностью протонированы. Тот факт, что гидролиз имина бензальдегида и *трет*-бутиламина подвергается катализу ацетатным ионом при pH 4...5 в условиях, в которых он полностью протонирован [26], исключает механизм (25) и подтверждает механизм (26).

Тот же принцип можно применить при определении механизма основного катализа, если реакцию проводить в условиях, при которых протон, способный к диссоциации, полностью удален от субстрата. Так, реакция обратимого присоединения кислых тиолов к карбонильной группе ацетальдегида подвергается общесловному катализу, и можно было бы думать, что он протекает в соответствии с механизмом (33)



Однако фактически реакция протекает в соответствии с кинетически эквивалентным механизмом (34),



так как катализ наблюдается также и в условиях, при которых тиол находится почти полностью в анионной форме и никакого заметного увеличения скорости не может быть в результате удаления протона от оставшегося небольшого количества свободного тиола (27).

В настоящее время не известны реакции, в которых было бы показано, что заметный общий кислотный или основной катализ наблюдается для термодинамически «легких» стадий, таких, как протонирование имина с $pK \sim 7$ или отрыв протона от кислого тиола. Можно сделать эмпирическое обобщение, что общий кислотный или основной катализ протекает таким путем, чтобы исключить образование особенно нестабильных промежуточных соединений и переходных состояний, похожих на такие промежуточные соединения. В механизмах, описываемых уравнениями (26) и (34), общий кислотно-основной катализ позволяет избежать образования нестабильных оксониевого и алкоксильного ионов соответственно.

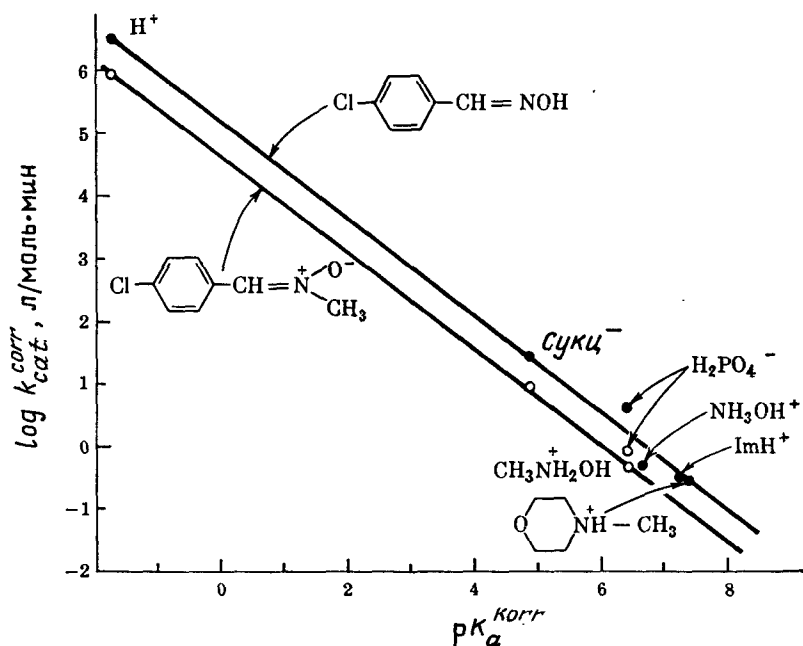
б) *Модельные соединения*. Вследствие подвижности протона его положение на том или ином атоме в переходном состоянии невозможно определить из уравнения скорости реакции. Однако, если протон заместить на метильную группу и если положение метильной группы (полярность которой лишь слегка отличается от полярности протона) известно, то по наблюдаемому поведению модельного соединения можно сделать заключение о поведении соответствующего протонированного соединения. Так, стадия дегидратации при образовании оксима подвергается общекислотному катализу и может протекать либо по механизму (25), либо по механизму (26) в направлении справа налево. Механизм уравнения (25) требует, чтобы сопряженное основание катализатора удалило протон от атома азота. Если катализатор не может удалить метильную группу, замещающую протон, то при условии, что механизм (25) верен, катализ не должен наблюдаться на соответствующей стадии образования нитрона [схема (35)], которая аналогична рассматри-



ваемой стадии образования оксима, за тем исключением, что протон замещен на метильную группу. Однако если катализ образования нитрона все же происходит, механизм (25) исключается, а в согласии с экспериментальными данными осуществляются механизмы (26) и (36). Как показано на рис. 8,

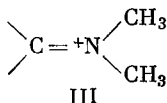


стадия дегидратации образования нитрона из *n*-хлорбензальдегида подвергается общекислотному катализу и имеет наклон Брэнстеда, равный 0,77, такой же, как и для реакции образования оксима (28)*. Это указывает на то, что обе реакции протекают по одному механизму [схема (26)].



Р и с. 8. Зависимость Брэнстеда для общекислотного катализа образования оксима и нитрона [28].

Тот же принцип был использован при установлении механизма катализа атаки водой иминов при исследовании гидролиза бензгидрилидендиметиламмониевого иона (III). Это соединение является моделью сопряженной кислоты бензгидрилиденметиламина, и тот факт, что катализ наблюдается

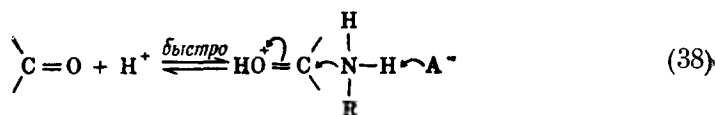


для обоих соединений, исключает механизм (25) и подтверждает механизм (26) для обеих реакций [29].

в) *Термодинамически нестабильные промежуточные соединения и диффузионно контролируемый предел.* Механизм реакции, который включает

* Тот факт, что катализ также наблюдается в реакции с метоксиамином показывает, что при образовании нитрона катализ не включает удаления протона от гидроксильной группы гидроксиламина.

образование нестабильного промежуточного соединения, может быть исключен в том случае, если можно показать, что промежуточное соединение (для обеспечения наблюдаемой скорости реакции) должно реагировать с другими реагентами в растворе со скоростью, превышающей диффузионно-контролируемый предел. Так, катализ реакции между семикарбазидом и *n*-нитробензальдегидом может иметь место как общекислотный катализ с передачей протона общей кислоты на карбонильную группу [схема (37)] либо протекать как общесосновной катализ атаки семикарбазида по сопряженной кислоте *n*-нитробензальдегида [схема (38)]



Кинетически неразличимые уравнения скорости для этих двух реакций имеют вид

$$v = k[RNH_2][>C=O][H^+], \quad (39)$$

и

$$v = k'[RNH_2][>C=\overset{+}{O}H] = \frac{k'}{K_A} [RNH_2][>C=O][H^+] \quad (40)$$

соответственно, где K_A — константа диссоциации сопряженной кислоты *n*-нитробензальдегида [уравнение (41)]

$$K_A = \frac{[>C=O][H^+]}{[>C=\overset{+}{O}H]}. \quad (41)$$

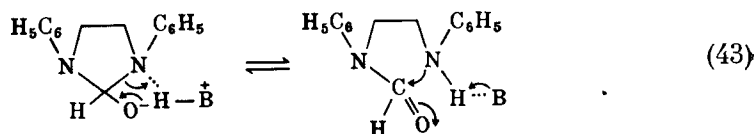
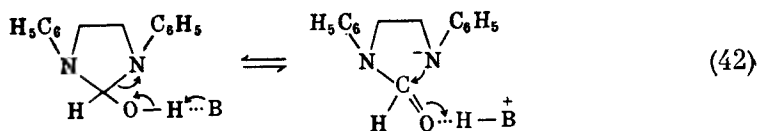
Основанное на H_0 (шкале кислотности) и найденное спектрофотометрическим методом [30] значение K_A равно $10^{8,45}$. Если механизм (38) верен, величина k' должна быть равна $2,7 \cdot 10^{13}$ л/моль·с, поскольку экспериментально найденное значение k равно 10^4 л²/моль²·с. Эта величина больше, чем константа скорости самой быстрой известной диффузионно-контролируемой реакции в воде — реакции сольватированного протона с ионом гидроксила [31]. Это исключает образование сопряженной кислоты *n*-нитробензальдегида в качестве свободного промежуточного соединения и указывает на то, что для этой реакции верен механизм (37) *. Подобные вычисления могут быть спорными, поскольку шкала кислотности H_0 может точно не соблюдаться для бензальдегидов, но аналогичные вычисления для других реакций, если они протекают через сопряженную кислоту альдегида, требуют даже больших значений константы скорости k' . Так, катализируемая кислотой атака формальдегида тетрагидрофолевой кислотой в случае, если она протекает через этот механизм [33], должна иметь константу скорости $7,4 \cdot 10^{15}$ л/моль·с. На этом основании можно, по-видимому, утверждать, что подобные сопряженные кислоты не включаются в качестве свободных промежуточных соединений в реакции такого типа.

Остается предположить, что переходное состояние реакции (38) можно достигнуть путем, который не включает сопряженную кислоту альдегида

* Фактически реакция (38) является процессом третьего порядка, в котором вода действует как общесосновной катализатор. Предполагается, что водород семикарбазида связан водородной связью с водой, и этот комплекс атакует протонированный альдегид по реакции второго порядка. Если водородной связи нет, положение будет еще менее предпочтительным.

в качестве промежуточного соединения, но это кажется маловероятным. Альдегид мог бы сначала образовать слабый комплекс с азотистым основанием, за которым следовала бы реакция с протоном с образованием протонированного промежуточного соединения, и, наконец, переход промежуточного соединения в переходное состояние. Однако известные константы равновесия образования таких комплексов аминов с карбонильными соединениями очень малы даже в неводных растворителях [32, 34], и ни в одном случае, по-видимому, комплексообразование не вызывало большого увеличения основности карбонильной группы. Единственно остающаяся возможность, по-видимому, заключается в том, что это переходное состояние образуется непосредственно тримолекулярной реакцией без образования нестабильных промежуточных соединений. Однако последнее потребует, чтобы молекула кислоты, которая передает протон карбонильной группе, присутствовала бы в переходном состоянии, что является принципиальной чертой механизма (37), а не (38).

То же рассуждение можно применить к анализу констант скоростей обратной реакции. Так, неблагоприятная константа равновесия для образования аниона анилина (pK_a анилина приблизительно равно 27) [35] требует, чтобы это нестабильное промежуточное соединение реагировало со скоростью, большей, чем диффузионно контролируемая скорость, для удовлетворения вычисленной скорости обратной реакции схемы (42) (разложение тетраэдрического промежуточного продукта присоединения в реакции гидролиза дифенилимидазольного катиона) [36]. Механизм, представленный схемой (43), для этой реакции более предпочтителен. Можно сделать поэтому обобщение, заключающееся в том, что анионы обычных аминов не образуются в качестве свободных промежуточных соединений в реакциях, протекающих в водном растворе; их образование часто предотвращается путем общего кислотно-основного катализа.



Применительно к более широкому кругу объектов это положение можно свести к утверждению, что свободная энергия образования промежуточного соединения в реакции не может быть заметно больше, чем общая свободная энергия активации реакции (за исключением случая цепных реакций). Если учесть, что переходное состояние имеет одну степень свободы (вдоль координаты реакции), которую приходится опустить из расчетов, то теоретический предел свободной энергии образования промежуточного соединения должен быть приблизительно на 5000 кал/моль (20 930 Дж/моль) меньше свободной энергии активации [37].

г) *Структурнореакционные корреляции и постулат Хаммонда.* Широко распространено мнение, что должна существовать корреляция между равновесиями и константами скорости реакции, т. е. реакции, которые термодинамически имеют большую движущую силу, должны протекать быстрее. Беглое рассмотрение показывает, что такая корреляция в общем случае не имеет места: энергетически выгодное окисление органических соединений

на воздухе может не происходить в течение многих лет, в то время как энергетически невыгодная гидратация двуокиси углерода протекает за секунды. Тем не менее существует некоторый элемент достоверности в этом утверждении, а именно в случае реакции, в которой переходное состояние имеет структуру, промежуточную между структурой исходных веществ и продуктов реакции; факторы, которые стабилизируют структурные особенности в продуктах реакции, будут стабилизировать их относительно исходных веществ и в переходном состоянии, следовательно, в данном случае будет наблюдаться корреляция скорости реакции с положением равновесия. Тот факт, что переходные состояния часто (но не всегда) имеют некоторые общие

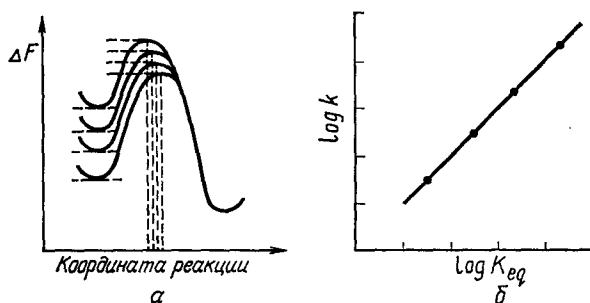


Рис. 9. Соотношение скоростей и равновесий при щелочном гидролизе эфиров.

a — Диаграмма переходных состояний для серии эфиров, в спиртовую часть которых введены заместители с увеличивающейся электроноакцепторной способностью; *б* — соотношение линейности свободной энергии для скоростей и равновесий этой же серии эфиров.

черты с продуктами реакции, объясняет существование таких корреляций внутри данной реакционной серии. Каким образом данное структурное изменение может оказывать пропорциональный эффект на скорость реакции и равновесие, иллюстрируется рис. 9, *a* на примере омыления эфиров: с одной стороны, введение электроноакцепторных групп в спирт делает протекание реакции термодинамически более выгодным [38], с другой — происходит параллельное уменьшение энергии переходного состояния относительно исходных веществ и увеличение скорости омыления. В этом случае эффект влияния электронооттягивающих заместителей лучше всего объясняется дестабилизацией исходного соединения как в отношении переходного состояния, так и в отношении продуктов реакции вследствие энергетически неблагоприятного взаимодействия с электроотрицательной карбонильной группой. Эта корреляция может быть представлена в виде логарифмической зависимости (рис. 9, *б*), которая, поскольку она связывает свободные энергии активации со свободными энергиями реакции, являются примером линейной взаимосвязи свободных энергий.

Из рассмотрения диаграммы переходных состояний на рис. 9, *a* можно сделать и другой важный вывод. Если предположить, что форма энергетической кривой существенно не изменится при изменении структуры реагирующих веществ, то из диаграммы переходных состояний рис. 9, *a* следует, что переходное состояние для более быстрой и термодинамически более выгодной реакции возникает на более ранних стадиях вдоль координаты реакции. Другими словами, в более быстрой реакции образование новой и разрушение старой связи будут происходить в меньшей степени, чем в более медленной реакции, т. е. переходное состояние будет больше походить на исходные реагенты, чем на продукты реакции. Этот принцип наиболее очевиден в предельном случае (рис. 10): когда энергия активации для сильноэкзотермической реакции очень мала, исходные материалы и переходные состояния будут почти идентичны. Существование такого рода соотношения

отмечалось много раз [39], но наиболее широко оно известно как постулат Хаммонда.

Уравнения линейностей свободных энергий могут дать корреляцию между собой, и некоторые такие корреляции приводят к результатам, которые можно рассматривать как количественное выражение постулата Хаммонда [40—42]. Корреляции, которые в данном случае интересны, являются соотношением Брэнстеда для общекислотного катализа [уравнение (44)] и соотношением типа Свейна — Скотта [43] для нуклеофильной реакционной способности n и чувствительности к нуклеофильной атаке s :

$$\log k_{i,j} = \log G_i^A - \alpha_i pK_{a,j} \quad (44)$$

[уравнение (45)]. Индексы в этих уравнениях относятся к отдельным реагентам или реакционным сериям.

$$\log k_{j,k} = \log k_{j,o} + n_k s_{j,k} \quad (45)$$

Уравнения (44) и (45) можно скомбинировать, что даст соотношения

$$pK_2 - pK_1 = c_2 (s_2 - s_1) \quad (46)$$

и

$$n_k = c_2 (\alpha_o - \alpha_k), \quad (47)$$

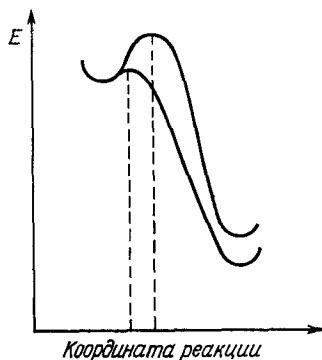
в которых c_2 является постоянной величиной [42, 44]. Уравнение (46) в соответствии с постулатом Хаммонда утверждает, что, если субстрат становится более реакционноспособным благодаря катализу более сильной кислотой (pK_2 уменьшается), его избирательность по отношению к нуклеофильной реакционной способности атакующего реагента (s_2) уменьшается. Так, нуклеофильная атака карбонильной группы, которая катализируется сольватированным протоном, должна быть менее избирательна по отношению к нуклеофилу, чем реакции того же карбонильного соединения, которые катализируются водой. Катализ сильной кислотой уменьшает энергетическую разность между исходными соединениями и переходным состоянием и, таким образом, в соответствии с постулатом Хаммонда делает переходное состояние более похожим на исходное состояние, т. е. переходное состояние достигается на более ранних стадиях движения вдоль координаты реакции. В этом случае будет достигаться меньшая степень образования связи с атакующим нуклеофильным реагентом и, следовательно, будет наблюдаться меньшая избирательность в отношении нуклеофильного агента. Уравнение (47) описывает обратное соотношение, а именно если нуклеофильная реакционная способность атакующего реагента n_k возрастает, реакция будет обнаруживать меньшую чувствительность к силе кислотного катализатора, т. е. значение α будет меньше.

Аналогичные соотношения для основоного катализа представлены уравнениями (48) и (49):

$$pK_2 - pK_1 = c_5 (s_1 - s_2), \quad (48)$$

$$n_i c_5 = \beta_o - \beta_i. \quad (49)$$

Уравнение (48) показывает, что, если катализирующее основание становится более сильным, селективность к нуклеофильному реагенту будет уменьшаться. Уравнение (49) утверждает, что если реакционная способность нуклеофильного реагента становится больше, то чувствительность реакции к основоному катализу, измеряемая брэнстедовским коэффициентом β ,



Р и с. 10. Энергетический профиль, который показывает, что переходное состояние для высокоэкзотермической реакции возникает раньше вдоль координаты реакции.

будет уменьшаться. В уравнениях (46)—(49) не использованы другие предположения, кроме тех, на которых основаны исходные соотношения Брёнстеда и Свейна — Скотта. Однако предположение, что знак константы s положительный, связывает эти уравнения с принципом постулата Хаммонда и находится в согласии с экспериментом. Уравнения (46) и (47) относятся к истинному общекислотному катализу, но не к его кинетическому эквиваленту — специфическому кислотному — общесновному катализу. Аналогично уравнения (48) и (49) описывают истинный общесновной катализ, а не специфический основной — общекислотный катализ.

Эти соотношения обеспечивают, таким образом, метод для разрешения кинетической двусмысленности между общекислотным и специфически кислотным — общесновным катализом, так как α для общекислотного катализа должно быть равно $1 - \beta$ для той же серии катализаторов, если реакция фактически представляет собой специфический кислотный — общесновной катализ, и наоборот. Это соотношение можно легко продемонстрировать алгебраическим или числовым примером. Так, исследованием серии родственных реакций, в которых α или β (которое равно $1 - \alpha$) увеличивается с уменьшением нуклеофильной реакционной способности атакующего реагента, можно определить, подчиняются ли реакционные серии уравнению (47) или (49), т. е. является ли наблюдаемый катализ истинным общекислотным катализом или специфическим кислотным — общесновным катализом.

Серии значений α для атаки ацетальдегида и бензальдегидов нуклеофильными реагентами с уменьшающейся основностью и нуклеофильной способностью приведены в табл. 3 [13, 26, 27, 42, 44—52]. Видно, что чувствительность к силе катализирующей кислоты непрерывно возрастает

Таблица 3

Значения α для общекислотного катализа присоединения нуклеофильных реагентов к ацетальдегиду и бензальдегидам

Нуклеофил	pK_a	Альдегид	α	Литература
HOO^-	11,6	$\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CHO}$	0	13
RNH_2	~ 10	$\text{XC}_6\text{H}_4\text{CHO}$	0	26, 45
RS^-	~ 10	CH_3CHO	0	44
CN^-	9,4	Несколько	~ 0	46
SO_3^{2-}	7,0	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$	~ 0	47
NH_2OH	6,0	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$	Очень мало	48
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNH}_2$	5,2	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$	0,20	49
$\text{XC}_6\text{H}_4\text{S}^-, \text{CH}_3\text{COS}^-$	3...6	CH_3CHO	0,20	27
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	4,6	$\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CHO}$	0,25	50
$\text{H}_2\text{NNHCONH}_2$	3,7	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CHO}$	0,25	42, 51
H_2NCONH_2	0,2	CH_3CHO	0,45	49
H_2O	-1,7	CH_3CHO	0,54	52
RSH	~ -7	CH_3CHO	$\sim 0,7$	44
HOON	~ -7	$\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CHO}$	1,0	13

по мере того, как уменьшается нуклеофильность атакующего реагента. Это согласуется с тем, что ожидается для истинного общекислотного катализа [уравнение (47)] в прямой реакции, который эквивалентен специфически кислотному — общесновному катализу в обратной реакции и противоречит тому, что ожидалось бы для специфически кислотного — общесновного катализа [уравнение (49)] прямой реакции, а это эквивалентно общекислотному катализу в обратной реакции. К тому же выводу пришли Свейн и Ворш,

исследуя атаку карбонильной группы азотистыми нуклеофилами, однако при использовании двух других соотношений: структура — реакционная способность, «правила реагирующей связи» и «правила сольватации» [53].

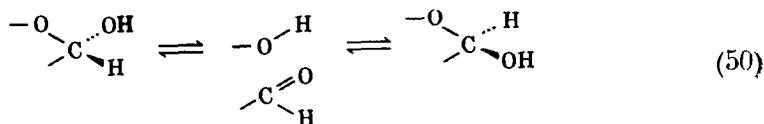
Более ограниченные данные, известные для реакций присоединения карбонильных соединений, которые, согласно кинетическим данным, протекают в прямом направлении по механизму общесредного катализа, указывают, что это действительно общесредной катализ для слабых кислотных нуклеофилов, а не кинетически эквивалентный специфически основной — общекислотный катализ [54].

В специальных случаях для установления механизмов катализа могут быть полезны и другие критерии. Так, если можно показать, что основные частицы нуклеофила атакуют карбонильную группу без помощи общекислотного катализа, то в этом случае любой наблюдаемый общесредной катализ атаки сопряженной кислоты нуклеофила нельзя интерпретировать как общекислотный катализ атаки основных частиц. Положительное отклонение константы скорости катализа гидроксильным ионом от прямой Брэнстеда указывает на то, что механизм реакции включает непосредственную нуклеофильную атаку нуклеофила, который образуется в предшествующей быстрой равновесной стадии (специфический основной катализ). Этот критерий использовали при изучении реакции присоединения перекиси водорода к альдегидам, для которой положительное отклонение иона гидроксила было интерпретировано как свидетельство непосредственной атаки анионом перекиси водорода [13] (гл. 10, разд. Б, 2).

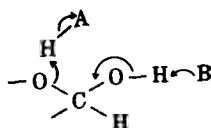
Г. СОГЛАСОВАННЫЙ ОБЩИЙ КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ КАТАЛИЗ РЕАКЦИИ «ОДНОГО СТОЛКНОВЕНИЯ» И ОБМЕН ПРОТОНА С РАСТВОРИТЕЛЕМ

1. МУТАРОТАЦИЯ ГЛЮКОЗЫ

Часто предполагают, что чрезвычайно высокая каталитическая активность ферментов может быть результатом согласованного действия в активном центре двух или нескольких общесредных или общекислотных катализаторов, действующих на различные части субстрата. Эти предположения в большей части берут начало от Лоури [55], который высказал гипотезу, что реакции, которые требуют как удаления, так и присоединения протона, такие, как мутаротация глюкозы [схема (50)], протекают по согласованному



механизму, в котором (для того чтобы реакция шла) должен осуществляться катализ обоих процессов переноса протона (IV)



IV.

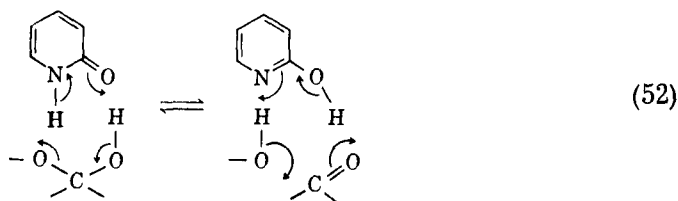
В случае если кислотный или основной катализатор не добавляется в систему, функции акцептора и донора протона должен играть растворитель. В подтверждение этой точки зрения было показано, что мутаротация глюкозы или тетраметилглюкозы протекает очень медленно или совсем не протекает

в апротонных или слабоосновных растворителях, таких, как безводный бензол, но существенно ускоряется добавлением малых количеств воды. В чистом пиридине или крезоле не происходит заметной реакции мутаротации, хотя каждое из этих соединений является катализатором данной реакции в воде. Однако если использовать смесь пиридина с крезолом, так что в растворе будут присутствовать как доноры, так и акцепторы протонов, то будет идти быстрая реакция.

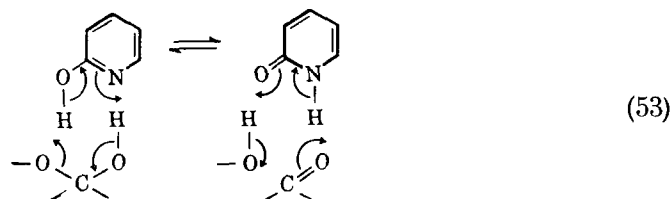
Свейн и Браун расширили эти представления при исследовании кинетики мутаротации тетраметилглюкозы в бензоле, катализируемой пиридином и фенолом [56]. Было найдено, что эта реакция подчиняется уравнению скорости третьего порядка

$$v = k[\text{глюкоза}][\text{фенол}][\text{пиридин}]. \quad (51)$$

Из этого уравнения следует, что как фенол, так и пиридин (или фенольный или пиридиновый ионы) необходимы для образования переходного состояния и действуют, по-видимому, *одновременно* в качестве кислоты и основания. Полагая, что если кислотная и основная группы скомбинированы в одной молекуле катализатора, то такой катализ должен быть более эффективным даже в разбавленном растворе, они нашли, что α -пиридон (α -оксипиридин) и бензойная кислота являются эффективными катализаторами при низких концентрациях, несмотря на то что катализирующие группы этих молекул являются существенно более слабыми кислотами и основаниями, чем фенол и пиридин. Было найдено, что 0,05 М раствор α -пиридола обеспечивает в 50 раз более высокую скорость мутаротации, чем эквивалентные концентрации фенола и пиридина; в более разбавленных растворах разница в скоростях еще больше. Механизм этого катализа представлен схемой



«Пушпульный» катализ основной карбонильной группой и кислотной N — H группой облегчает расщепление полуацетата, давая свободный альдегид; в обратной реакции замыкания кольца происходят переносы протона с образованием смеси α - и β -форм сахара. Несмотря на тот факт, что α -пиридон существует преимущественно в форме пиридола, а не α -оксипиридина, принцип микроскопической обратимости требует, чтобы катализ обратной реакции в соответствии с механизмом (52) включал таутомер α -оксипиридин. Равновероятный механизм (первоначально предложенный Свейном и Брауном) включает катализ α -оксипиридином в прямом направлении и α -пиридоном в обратном [схема (53)]



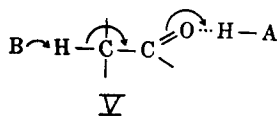
Использование этой реакции как модельного процесса согласованного кислотно-основного катализа затруднено тем, что каталитический эффект наблюдается только в бензоле; для мутаротации глюкозы в воде не было

замечено той особой эффективностью катализаторов, которая допускает согласованный катализ. Проведение реакции в бензоле создает такие экспериментальные условия, в которых вероятность существования такого катализа весьма велика. Отсутствие эффективных кислотных и основных групп в этом растворителе означает, что процессы переноса протона, которые являются существенной частью механизма реакции, могут протекать лишь с большим трудом, и, чтобы обеспечить протекание реакции с заметной скоростью, необходимо введение катализаторов. В воде — растворителе, который сам является эффективным донором и акцептором протонов, — согласованного катализа не наблюдается. Фермент должен катализировать реакцию быстрее, чем она протекает в воде, и можно было бы с большей уверенностью рассуждать о возможной роли согласованного кислотно-основного катализа в ферментах, если бы удалось показать на модели, что такой катализ эффективен и в водном растворе. Интерпретация этих экспериментов еще более затрудняется тем фактом, что реакции в бензоле чрезвычайно чувствительны к присутствию ионов, которые могут стабилизировать полярные переходные состояния в этом неполярном растворителе и появляться в результате реакции пиридина с фенолом, приводящей к образованию феноксид пиридиния. Феноксид тетрабутиламмония, который не имеет кислотных протонов, и некоторые другие соли являются эффективными катализаторами мутаротации тетраметилглюкозы в неполярных растворителях (57); точно так же и другие реакции обнаруживают ускорения до 10^5 при добавлении низких концентраций солей к неполярным растворителям [58].

Было сделано много попыток продемонстрировать существование согласованного кислотно-основного катализа для реакций, в которых протон удаляется от атома углерода. Такой катализ отдельными молекулами кислоты или основания для реакции енолизации кетона должен дать член третьего порядка в уравнении скорости

$$v = k[\text{HA}][\text{B}][\text{HCC}=\text{O}]. \quad (54)$$

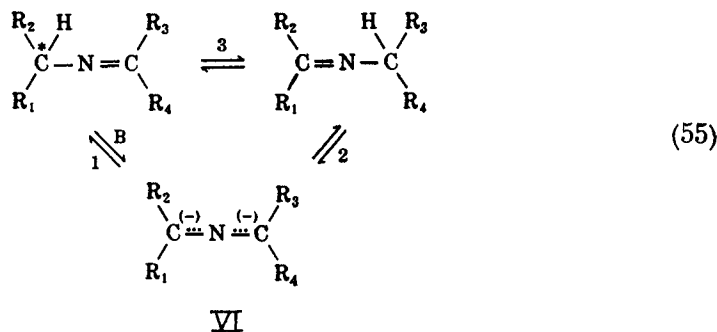
Этот механизм должен, по-видимому, включать присоединение протона к карбонильной группе по общекислотному катализу и в то же время удаление протона от атома углерода основанием (V).



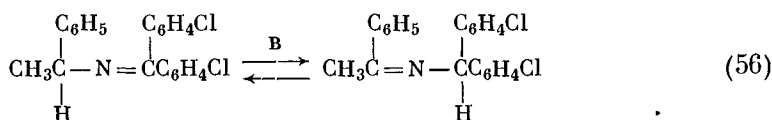
Такой член был обнаружен в уравнении скорости для катализа енолизации ацетона под действием уксусной кислоты и ацетата натрия [59, 60], но для большинства таких реакций этот тип катализа или не наблюдается, или не очень значителен. Возможно, что эти члены в уравнении скорости представляют катализ парой кислота — основание, связанной водородной связью $\text{A} - \text{H} \cdots \text{A}^-$, а не согласованный кислотно-основной катализ [59, 61]. Известно, что аналогичные частицы, связанные водородной связью $\text{F} - \text{H} - \text{F}^-$, являются эффективными катализаторами кето-енольного превращения ацетона [62]. Тем не менее уравнение скорости для кетонизации енола оксалацетата содержит член, соответствующий по форме уравнению (54), который существен при низких концентрациях фосфатного, имидазольного и триэтаноламинного буферов [63]. При тех концентрациях буферов, которые были использованы в этих опытах (от 0,1 до 0,2 М), существование заметной доли связанных водородной связью пар маловероятно, что указывает на проявление в этой реакции согласованного катализа.

2. БЕНЗИЛИДЕНБЕНЗИЛАМИНЫ

В течение многих лет наиболее убедительной моделью согласованного общего кислотно-основного катализа была катализируемая основаниями реакция изомеризации замещенных бензилиденбензиламинов {схема (55)} [64].



В этой реакции включение дейтерия из растворителя и изомеризация соединения в системе диоксан — EtOD протекают с одинаковой скоростью (2 : 1). Равенство этих скоростей исключает механизм, при котором происходит *обратимое* образование карбаниона VI, потому что если реакция 1 протекает быстрее, чем реакция 2, то рацемизация и обмен водорода должны иметь большую скорость, чем реакция в целом. Поэтому предположили, что реакция протекает согласованным образом по механизму 3 [схема (55)]. Однако, как недавно было показано, по крайней мере для реакции, представленной схемой (56), механизм должен быть иным. Эта изомеризация протекает в прямом направлении без обмена водорода с растворителем, но в обратном направлении скорость обмена водорода в 10—20 раз больше, чем скорость

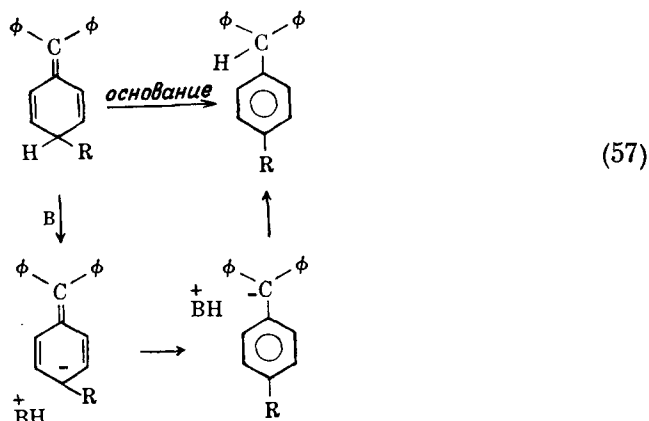


изомеризации [65]. Таким образом, реакция должна протекать через промежуточный карбанион, а не по согласованному механизму. Причина того, что не наблюдается обмена или рацемизации исходного соединения в прямой реакции, заключается в том, что реакция 2 схемы (55) протекает быстрее, чем реакция 1, и карбанион быстрее превращается в продукт реакции, чем возвращается в исходное соединение.

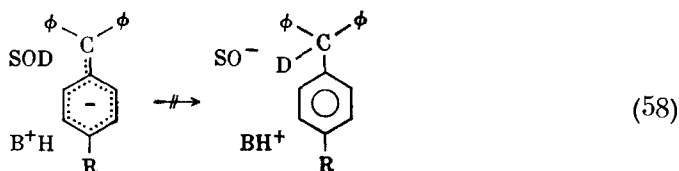
3. ОБМЕН ПРОТОНА С РАСТВОРИТЕЛЕМ

Наиболее интересным моментом в этой реакции является тот факт, что процесс переноса протона в прямой реакции в размере от 38 до 50% протекает без установления равновесия меченых протонов с растворителем в *трет*-бутанол — *трет*-бутоксиде. Это значит, что в одной трети-половине реакций один и тот же протон удаляется с одного конца молекулы и присоединяется к другому без обмена с гидролитическим растворителем. Еще более удивительный пример того же явления был обнаружен в ката-

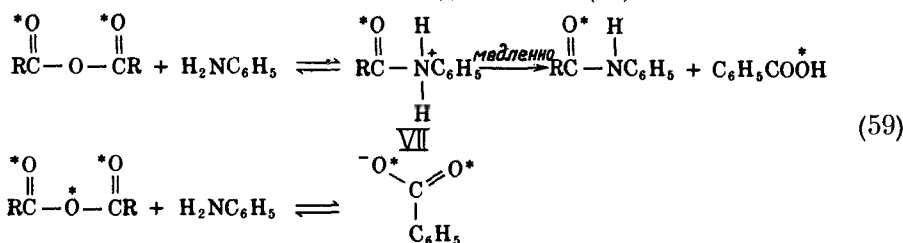
лизируемой основаниями реакции изомеризации, представленной схемой



В присутствии дейтерированного триэтилкарбинола в качестве растворителя перенос протона в этой реакции происходит на 98% без обмена с дейтронами растворителя [66]. Даже в присутствии 10% D₂O в тетрагидрофуране реакция протекает на 34% без обмена с растворителем. Протон должен быть захвачен основанием у одного конца молекулы и перенесен к другому без обмена с растворителем, и этот механизм должен быть более предпочтителен, чем присоединение протона к карбаниону от растворителя на другом конце молекулы. Крам [66] назвал это явление механизмом «сопровождения». Очевидно, в этих относительно неполярных растворителях образование и передвижение первоначально образованной ионной пары к другому концу молекулы — более легкий процесс, чем механизм, который требует образования локализованного отрицательного заряда в молекуле растворителя у другого конца молекулы субстрата [схема (58)].

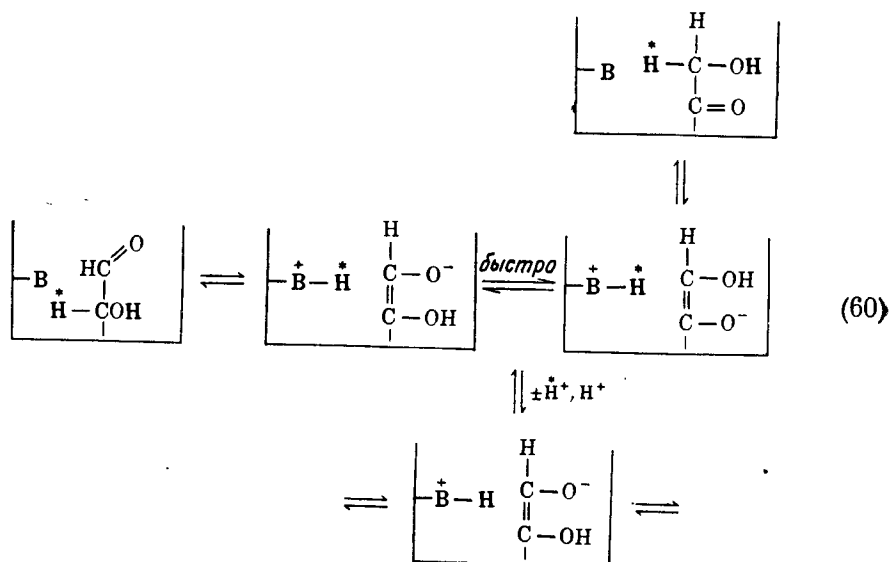


В некотором смысле аналогичная ситуация имеет место в реакции ангидрида бензойной кислоты с анилином [67]. Если реакция проводится с ангидридом, который мечен ¹⁸O только по карбонильной группе, то содержание ¹⁸O в продукте реакции бензанилиде свидетельствует о том, что атомы кислорода, как карбонильные, так и мостиковый, успевают прийти в изотопное равновесие, прежде чем образуется конечный продукт. Этот результат можно объяснить, если предположить, что бензоатный ион, который образуется из ангидрида, успевает усреднить изотопное содержание своих атомов кислорода и атаковать катион промежуточного соединения VII с образованием ангидрида быстрее, чем может произойти отщепление протона от VII с образованием стабильного бензанилида [схема (59)].



Эта обратная реакция будет приводить к усреднению изотопного содержания карбонильных и мостиковых атомов кислорода ангидрида. Было показано, что такое уравнивание имеет место в эфире и метаноле. Несмотря на то что в эфире контрольный опыт с бензойной кислотой, меченой ^{14}C , показал, что уравнивание не вызывается непосредственной атакой ангидрида бензоат-ионом, желательно провести аналогичные контрольные эксперименты и в других растворителях.

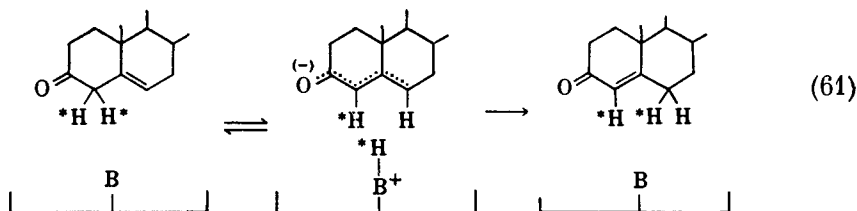
Очевидно, в некоторых химических реакциях, особенно в тех, которые проводят в неполярных растворителях, скорость установления равновесия ионогенных протонов с растворителем может быть меньше, чем скорость других реакций. То же справедливо для ферментативных реакций. Так, например, фосфоглюкозоизомеразы катализирует перенос протона в молекуле сахара от атома углерода 2 к атому 1 с образованием фруктозо-6-фосфата. То, что в этой реакции действительно переносится протон, почти не вызывает сомнений, так как меченый атом водорода в положении 2 в процессе переноса в положение 1 претерпевает частичный обмен с растворителем. Однако тот факт, что некоторые процессы переноса идут без обмена с растворителем, означает, что промежуточное соединение, в котором протон присоединен к основной группе активного центра фермента [схема (60)], может



передать протон в положение 1 с образованием продукта со скоростью, соизмеримой со скоростью установления прототропного равновесия с растворителем. Процессы переноса протона на атомы кислорода могут, по-видимому, идти очень быстро либо при помощи кислотно-основных каталитических групп фермента, либо как процесс непосредственной передачи. Отношение скоростей реакций обмена с растворителем и реакций переноса возрастает с увеличением температуры. Это значит, что первая реакция имеет более высокий температурный коэффициент [68].

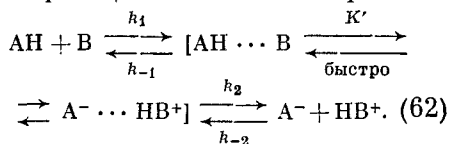
В случае фермента Δ^5 -3-кетостероидизомеразы, который катализирует аналогичный перенос протона, реакция переноса протекает быстрее, чем реакция обмена с растворителем, так что в процессе реакции переноса наблюдается лишь небольшое разбавление меченых атомов водорода протонами

растворителя {схема (61)} [69]



4. ПРОЦЕССЫ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА, КОНТРОЛИРУЕМЫЕ ДИФфуЗИЕЙ

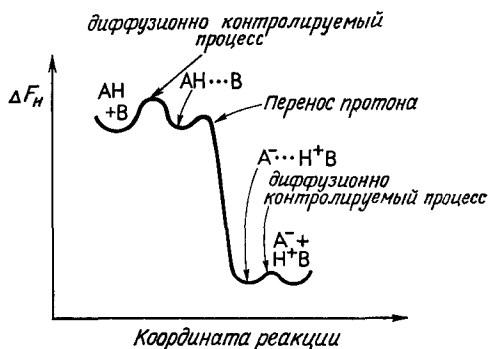
Одно время считали, что отсутствие равновесного обмена протонов с растворителем в реакциях, включающих перенос водорода, означает, что переносится не протон, а гидрид-ион или атом водорода, поскольку скорость обмена этих частиц с протонами воды не должна быть слишком высокой. В настоящее время установлено, что это не так, и, более того, никого не удивляет, что во многих реакциях обмен протонов с растворителем — относительно медленный процесс. Для рассмотрения этого вопроса необходимо более детально обсудить свойства диффузионно контролируемых процессов переноса протона между атомами O, N и S [16]. Изучение этих важных реакций в значительной степени способствовало пониманию механизма кислотно-основного катализа. Полная схема реакции иллюстрируется схемой (62), а диаграмма изменений свободной энергии в процессе реакции показана на рис. 11.



Предположим, что НА — более сильная кислота, чем НВ⁺ (заряды кислоты и основания заданы произвольно).

Для реакции в прямом направлении наблюдаемая константа скорости k_f почти для всех таких процессов была найдена близкой или равной пределу, ограниченному диффузией реагентов, т. е. 10^{10} л/моль·с. Таким образом, практически каждый раз, когда молекулы НА и В сталкиваются, происходит перенос протона. Это значит, что константа скорости самой стадии переноса протона выше, чем константа (k_{-1}) для возвращения АН...В в исходное состояние, и что перенос протона осуществляется быстрее, чем стадия диффузии. Другими словами, свободноэнергетический барьер стадии переноса протона меньше, чем барьер диффузионно контролируемой стадии (рис. 11).

Обратная реакция А⁻ с НВ⁺ протекает с общей константой скорости k_r , которая меньше, чем константа диффузионно контролируемой стадии. Константу скорости обратной реакции можно легко вычислить, если известна константа равновесия и константа скорости прямой реакции [уравнения (63)]



Р и с. 11. Диаграмма свободная энергия — координата реакции для контролируемого диффузией процесса переноса протона от АН к В при условии, что АН является более сильной кислотой, чем ВН⁺.

и (64)]

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_f}{k_r}, \quad (63)$$

$$k_r = \frac{k_f}{K_{\text{eq}}}. \quad (64)$$

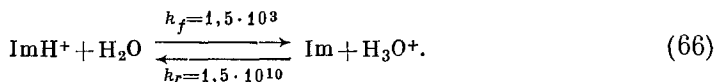
Причина того, что скорость переноса протона от HB^+ к A^- много меньше, чем диффузионно контролируемая реакция, заключается в том, что диффузионно контролируемой стадии предшествует неблагоприятная равновесная стадия — перенос протона от HB^+ к A^- . После такого переноса продукт $\text{AH} \cdots \text{B}$ будет возвращаться в $\text{A}^- \cdots \text{HB}^+$ во много раз быстрее, чем $\text{AH} \cdots \text{B}$ разделится, давая AH и B . Важным моментом является тот факт, что, несмотря на то что общая скорость обратной реакции много меньше диффузионно контролируемой, скорость определяющая стадия не включает перенос протона между BH^+ и A^- и свойства этой лимитирующей стадии определяются равновесием образования $\text{AH} \cdots \text{B}$ из A^- и HB^+ и скоростью разделения этих частиц. Поскольку скорости диффузионно контролируемых стадий ассоциации и диссоциации мало зависят от кислотности реагирующих веществ, скорость обратной реакции почти всецело определяется равновесием стадии переноса протона.

Реакция переноса протона в обратном направлении — один из примеров, в котором относительно малая наблюдаемая константа скорости отражает неблагоприятный равновесный процесс, предшествующий диффузионно контролируемой стадии. Подобная ситуация имеет большое значение при обсуждении механизмов реакций, поскольку это значит, что свойства (такие, как изотопные эффекты) даже сравнительно медленных реакций отражают равновесие и диффузионно контролируемый процесс, а не образование и разрушение ковалентных связей в скорости определяющей стадии.

Предположим, что в ферменте, катализирующем реакцию переноса протона, например в фосфоглюкозоизомеразе или в кетостероидизомеразе, основанием, которое удаляет протон от углерода, является имидазольный остаток гистидина. Чтобы произошел протонный обмен, необходим перенос протона от сопряженной кислоты имидазола к растворителю, что может быть результатом реакции с ионом гидроксила или с водой. Реакция с ионом гидроксила [уравнение (65)] протекает в благоприятном для равновесия направлении с константой скорости, соответствующей диффузионно контролируемому пределу $2,3 \cdot 10^{10}$ л/моль·с:



При $\text{pH } 7$ активность ионов гидроксила равна 10^{-7} М; таким образом, наблюдаемая константа скорости для переноса протона по этому механизму должна была бы быть $2,3 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$. Реакция с водой протекает с константой скорости, меньшей чем диффузионно контролируемый предел, поскольку равновесие в этом направлении неблагоприятно [уравнение (66)].



Константу скорости для переноса протона в этом направлении можно легко вычислить ($k_f = 1,5 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$) из константы диссоциации иона имидазола, равной 10^{-7} М, и диффузионно контролируемой константы скорости реакции в обратном направлении ($1,5 \cdot 10^{10}$ л/моль·с) {уравнения (63) и (66)} [70]. Скорость переноса протона существенно не изменится при замещении имидазола другим основанием или умеренным изменением pH в области нейтральности. Константы скорости порядка 10^3 с^{-1} для реакций обмена протона с растворителем не слишком большие по сравнению с диапазоном констант скоростей

для ферментативных реакций. Число оборотов Δ^5 -3-кетостероидизомеразы равно $2,8 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$ при 25°C и $\text{pH } 7,0$ [69]. Отдельные стадии в каталитическом процессе должны протекать по крайней мере также быстро, как и реакция в целом, так что стадии переноса протона внутри фермент-субстратного комплекса осуществляются быстрее, чем обмен протона с растворителем. Таким образом, чтобы объяснить наблюдаемое отсутствие обмена с растворителем, нет необходимости постулировать какой-либо механизм, «защищающий» активный центр от проникновения в него протонов растворителя. Числа оборотов глюкозофосфатизомераз [71] лежат в диапазоне $2,5 \dots 6 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$. По порядку величин эти значения сравнимы с ожидаемыми скоростями обмена протона, так что частичный обмен протона с растворителем в этой реакции не представляется неожиданным.

Эти реакции можно рассматривать с другой точки зрения как конкуренцию за обладание протоном между растворителем и акцептором протона в активном центре фермента. Перенос протона на растворитель приводит к реакции обмена, перенос на акцептор дает ферментативную реакцию. В обеих описанных выше реакциях энзиматический процесс включает присоединение протона к карбаниону. Известно, что перенос протона на сильно-основные карбанионы происходит достаточно быстро и может протекать даже с диффузионно контролируемой скоростью. Скорость переноса протона от кислоты с $\text{pK } 7$ на енолят ацетилацетона [16] равна приблизительно $10^5 \text{ л/моль} \cdot \text{с}$, так что можно ожидать, что внутри активного центра фермента перенос протона на енолятный ион будет эффективно конкурировать с обменом протона с водой.

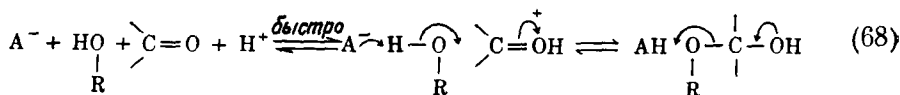
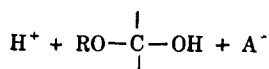
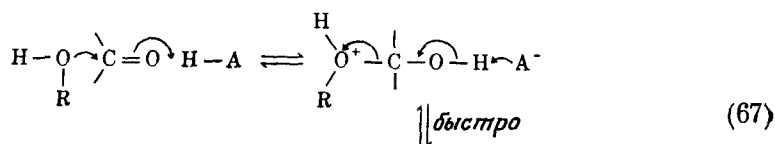
Энергия активации для диффузионно контролируемых реакций мала, однако теплота диссоциации воды и иона имидазолия велика — $13\,200$ и $7\,700 \text{ кал/моль}$ ($63\,500$ — $36\,900 \text{ Дж/моль}$) соответственно [72]. Эффективный температурный коэффициент реакции иона имидазолия с ионом гидроксила при $\text{pH } 7$ [уравнение (65)] будет большим вследствие увеличения концентрации ионов гидроксила с увеличением температуры. Тот же температурный коэффициент для реакции с водой [уравнение (66)] также будет большим, поскольку он определяется малым температурным коэффициентом диффузионно контролируемой стадии k_7 , уравнения (66) и большим температурным коэффициентом равновесия. Таким образом, очевидно, что с ростом температуры обмен протона с растворителем будет увеличиваться быстрее, чем реакция переноса протона в фосфоглюкозоизомеразе [68].

5. МЕХАНИЗМ «ОДНОГО СТОЛКНОВЕНИЯ» И СОГЛАСОВАННЫЙ* МЕХАНИЗМ

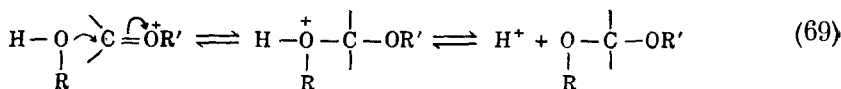
Скорость установления равновесия протона с растворителем тесно связана с вопросом о центре, на котором происходит катализ, и с вопросом о «согласованной» природе катализа. Обсудим возможные механизмы обще-кислотного катализа гидратации ацетальдегида или очень похожей реакции — мутаротации глюкозы, катализируемой по обще-кислотному механизму. Эти реакции могут протекать либо путем переноса протона на карбонильный атом кислорода и от него [схема (67)], либо путем переноса протона от атома кислорода атакующей или на этот же атом уходящей ROH -группы [схема (68)].

Ранее было отмечено, что корреляция структура — реакционная способность согласуется с первым из этих механизмов. При сравнении с механизмом гидролиза ацеталей второй механизм представляется маловероятным.

* Термин «согласованный» использован для перевода слова «concerted». В отечественной литературе иногда используют в том же смысле термин «синхронный», «сопряженный». — *Прим. ред.*



Гидролиз почти всех ацеталей подвергается только специфическому кислотному катализу, т. е. α для этой реакции равно или близко к 1,0 [73]. Эта реакция представлена схемой (69) в обратном направлении, прямое направление



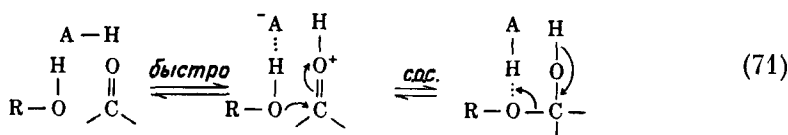
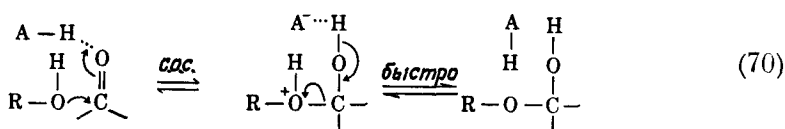
дает модель для гидратации ацетальдегида или мутаротации глюкозы по механизму (68); отличие от этого механизма заключается только в замещении алкильной группы R' на протон, который присоединяется в быстрой равновесной стадии реакции. Таким образом, если последние реакции протекают по уравнению (68), они должны иметь значение $\alpha \sim 1,0$, и тогда общекислотный катализ не должен быть заметным. Тот факт, что общекислотный катализ наблюдается со значениями α , равными 0,54 и 0,4 для гидратации ацетальдегида [14] и мутаротации глюкозы [74] соответственно, означает, что реакции гидратации отличаются от гидролиза ацеталей. Механизм, представленный схемами (68) и (69), является, таким образом, маловероятным для гидратации альдегида.

Очень простые расчеты, которые были сделаны Эйгеном [75], однако, показывают, что механизм (67) не может быть верен в его простейшей форме. Уравнение (67) в качестве промежуточного соединения включает сопряженную кислоту гидрата альдегида. В случае реакции, катализируемой водой, A^- представляет собой ион гидроксила и обратная реакция требует взаимодействия иона гидроксила с этим нестабильным промежуточным соединением. Разумные оценки значения pK для этого промежуточного соединения показывают, что оно будет присутствовать в таких низких концентрациях, что константа скорости для его реакции с ионом гидроксила должна быть выше, чем диффузионно контролируемый предел, чтобы обеспечить наблюдаемую константу скорости реакции в данном направлении. Существует вероятность, что реакция, катализируемая водой, фактически представляет основной, а не кислотный катализ и должна протекать не по механизму (67). Однако константа скорости, вычисленная для реакции, катализируемой гидрохиноном в обратном направлении, очень близка к диффузионно контролируемому пределу. Зависимость Брэнстеда должна «запределиваться» с приближением к диффузионно контролируемому пределу, и тот факт, что никакого «запределивания» для гидрохинона не наблюдается [14], является еще одним опровержением механизма (67).

Схема (68) в качестве промежуточного соединения включает сопряженную кислоту свободного альдегида. Если исходить из оценок кислотности таких нестабильных соединений, то в соответствии с механизмом (68) потребова-

лась бы еще большая константа скорости для атаки воды, катализируемой ионом гидроксила или какой-нибудь другой частицей A^- , чтобы обеспечить наблюдаемую скорость реакции. Аналогичная ситуация существует для реакции *n*-нитробензальдегида с семикарбазидом, катализируемой кислотой.

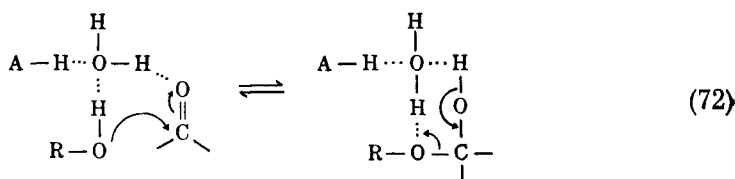
Таким образом, оба возможных механизма, которые были постулированы для этой реакции, по-видимому, исключаются. Существует два разных, но связанных между собой подхода для того, чтобы решить эту кажущуюся дилемму: механизм «одного столкновения» и «согласованный» механизм катализа. В соответствии с этими механизмами в реакциях, аналогичных представленным схемами (67) и (68), одна и та же молекула катализатора действует в качестве донора и в качестве акцептора протона. Проблема заключается в том, чтобы определить, что происходит в переходном состоянии и что обеспечивает движущие силы катализатора реакции. Два механизма «одного столкновения» могут быть записаны для гидратации ацетальдегида соответственно схемам (70) и (71).



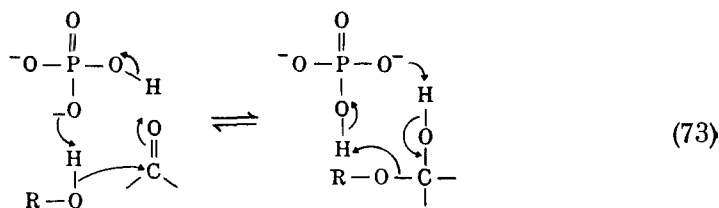
Эти механизмы совершенно аналогичны механизмам (67) и (68), за тем лишь исключением, что в каждом случае молекула катализатора осуществляет быстрый дополнительный перенос протона до или после скорость определяющей стадии, но в процессе одного и того же столкновения с реагирующими веществами. Поскольку диффузионно контролируемые реакции активных промежуточных соединений с молекулами вне реакционной «клетки» отсутствуют, диффузионно контролируемый предел снимается; в этих механизмах предполагается более высокая, чем диффузионно контролируемая скорость переноса протона внутри реакционной «клетки». В соответствии с механизмом (70) в прямом направлении скорость определяющая стадия включает взаимодействие карбонильной и гидроксильной групп, которое облегчается частичным переносом протона на карбонильный кислород в переходном состоянии; затем следует быстрый перенос протона от нестабильного промежуточного иона оксония на сопряженное основание катализатора, за которым происходит диффузионно контролируемое разделение продуктов. В обратном направлении за быстрой передачей протона катализатором следует скорость определяющий распад нестабильного иона оксония, который облегчается удалением протона от гидроксильной группы сопряженным основанием той же молекулы катализатора. Механизм (71) в прямом направлении реакции включает быструю передачу протона катализатором с образованием сопряженной кислоты карбонильного соединения; за этим следует скорость определяющая атака гидроксильной группой, которая облегчается частичным переносом в переходном состоянии протона на сопряженное основание того же катализатора. В обратном направлении катализатор облегчает реакцию, делая возможным частичный перенос в переходном состоянии протона на уходящую гидроксильную группу. Затем происходит быстрый перенос протона на сопряженное основание катализатора, за которым следует диффузионное разделение реагирующих веществ. (Как правило, при обсуждении таких механизмов один из них

кажется более привлекательным в зависимости от того, какое направление реакции выбирается для описания механизма. Всегда важно обсуждать механизм реакции в обоих направлениях с тем, чтобы избежать этой психологической ошибки.)

Согласованные механизмы открывают и другие возможности для исключения трудностей ступенчатых (постадийных) механизмов (67) и (68) [75]. Термин «согласованный» имеет несколько довольно разных значений, которые детально будут обсуждены позднее. Для настоящей цели термин «согласованный» будет означать, что в результате взаимодействия с катализатором либо непосредственно, либо посредством включения одной или нескольких молекул воды оба протона в переходном состоянии находятся в иных положениях по сравнению с исходными соединениями. Можно полагать, что молекула катализатора способна воздействовать на молекулы воды вокруг субстрата, чтобы облегчить одновременное присоединение и удаление протона [схема (72)].



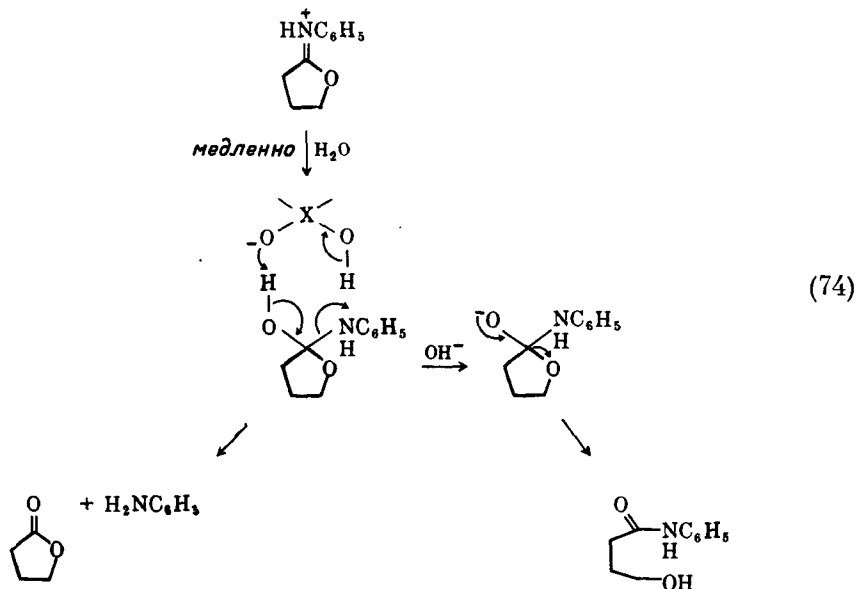
Трудно, однако, охарактеризовать природу движущих сил катализа такого рода для реакции в обоих направлениях. Весьма привлекателен согласованный механизм, который включает одновременное присоединение и отдачу протона бифункциональным катализатором, содержащим как кислотные, так и основные группы [схема (73)].



Аналогично одна или несколько молекул воды могут принимать участие во взаимодействии между катализатором и субстратом. Можно ожидать, что такой катализ будет наиболее эффективен, если кислотные и основные группы находятся на различных атомах катализатора, но связаны между собой системой связей таким образом, что активность основной группы будет увеличиваться, если протон удаляется от кислотной группы, как это происходит в моноанионе или дианионе фосфата. Однако даже один атом с несколькими свободными электронными парами, такой, как атом кислорода гидроксильной группы, может выступать в качестве донора и акцептора электронов; ион аммония не способен действовать как бифункциональный катализатор по этому механизму.

Несмотря на то что фосфат несколько более эффективен в реакции гидратации альдегидов, чем другие катализаторы сравнимой кислотности, ясно, что за счет бифункционального катализа в соответствии с механизмом (73) нельзя получить большую дополнительную стабилизацию ни для этой, ни для значительного числа других реакций в воде [116, 13, 76]. Из нескольких примеров, которые обсуждаются в гл. 2, следует, что согласованные кислотно-основные реакции в водном растворе имеют значение в тех слу-

чаях, когда основание действует как нуклеофил, а не как катализатор переноса протона. Одна из немногих реакций, в которых согласованный кислотно-основной катализ переноса протона в водном растворе дает большое увеличение скорости, представляет собой гидролиз *N*-фенилимино-лактонов, который изучали Каннинхем и Шмир [77] [схема (74)].



В этой реакции при значениях $\text{pH} > 2$ конечные стадии, приводящие к образованию продуктов, являются кинетически более быстрыми, чем скорость определяющая стадия атаки водой протонированного иминолактона, так что отношение лактона к анилиду в продуктах реакции возрастает с увеличением кислотности или концентрации буфера без изменения общей скорости реакции. Это значит, во-первых, что должен существовать общий промежуточный продукт и, во-вторых, что распад этого промежуточного продукта с образованием лактона и анилина катализируется одним из компонентов буферного раствора. Такие буферы, как фосфатный, ацетатный и бикарбонатный, которые содержат как кислотные, так и основные группы, направляют реакцию по пути образования лактона, в то время как буферы, содержащие только одну каталитическую группу, такую, как ион имидазолия, *n*-нитрофенол, трис-(оксиметил)-аминометан, существенно менее эффективны. Так, фосфат в качестве катализатора в 240 раз эффективнее, чем имидазольный буфер. Необходимо отметить, что обратная реакция этого процесса представляет собой аминолиз эфира анилином, поэтому можно ожидать, что и эта реакция также будет подвергаться согласованному общему кислотно-основному катализу.

Существует много реакций, которые подвергаются кислотному или основному катализу (или тому и другому) и которые хорошо подчиняются соотношению Брёнстеда без существенных отклонений для различных классов катализаторов. Катализаторы, которые имеют специфические структурные особенности для стимулирования согласованного кислотно-основного катализа, должны были бы обнаруживать большие положительные отклонения, поэтому отсутствие таких отклонений указывает, по-видимому, что такой катализ не имеет особенно важного значения для многих и, возможно, для большинства реакций этого типа. Отсутствие заметной стабилизации переходного состояния каким-либо видом циклической структуры особенно очевидно в таких реакциях, как образование нитрона и оксима [28], в которых заме-

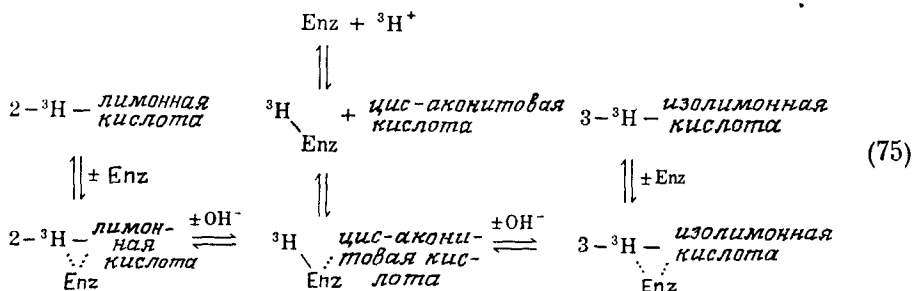
шение метильной группы на один из протонов не оказывает почти никакого влияния на характеристики катализируемой реакции (рис. 8). Важной проблемой в настоящее время является выяснение природы тех факторов, которые определяют наличие или отсутствие бифункционального катализа для реакций в водном растворе. Предположение, что ферментативно катализируемые реакции протекают намного быстрее по сравнению с теми же реакциями в воде за счет согласованного кислотно-основного катализа, остается при отсутствии полного экспериментального подтверждения как в химических, так и в ферментативных системах всего лишь привлекательной гипотезой.

Д. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

1. АКОНИТАЗА

Для реакций, которые включают удаление протона от атома углерода, таких, как изомеризация сахаров [68] и стероидов [69], удаление протона при содействии общесосновного катализа с участием активного центра фермента представляется, по-видимому, неизбежным. В некоторых случаях максимальные скорости реакций такого типа обнаруживают изотопные эффекты дейтерия в пределах $k_H/k_D = 2...6$ подобно изотопным эффектам, наблюдаемым в неэнзиматических реакциях.

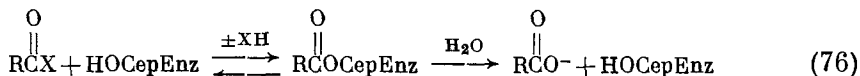
Особенно интересной реакцией такого типа является обратимая изомеризация лимонной кислоты в изолимонную, катализируемая аконитазой. Эта реакция протекает через дегидратацию лимонной кислоты с образованием *цис*-аконитовой кислоты, после чего следует гидратация двойной связи в противоположном направлении с образованием изолимонной кислоты, причем в процессе реакции *цис*-аконитовая кислота не должна отщепляться от фермента. Если реакцию проводят с 2-метил-2- ^3H -лимонной кислотой в качестве субстрата в присутствии высокой концентрации *цис*-аконитовой кислоты, то в результате реакции получается изолимонная кислота, меченная тритием в положении 3 [78]. Это значит, что метил-*цис*-аконитовая кислота, которая первоначально образуется, может покинуть фермент и быть заменена на незамещенный *цис*-аконитат много быстрее, чем атом трития, перенесенный на общее основание фермента, будет замещен протонами среды. Общий механизм этой реакции представлен схемой:



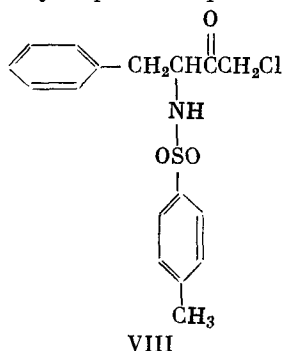
В этой реакции не происходит непосредственного переноса атома кислорода гидроксильной группы. Stereoхимия реакции требует присоединения протона к разным концам двойной связи *цис*-аконитовой кислоты с образованием двух продуктов, поэтому тот факт, что происходит внутримолекулярный перенос трития, предполагает, что связанный *цис*-аконитат может вращаться без обмена протона с растворителем, оставаясь привязанным к ферменту.

2. ХИМОТРИПСИН

В ферментативных реакциях, которые включают перенос протона к атомам или от атомов кислорода, азота или серы, точно доказать прохождение общего кислотно-основного катализа еще труднее. В настоящее время самые строгие свидетельства в пользу его существования в ферментативных реакциях имеются для химотрипсина. В гл. 2 было показано, что гидролиз этим ферментом субстратов, которые содержат активированную ацильную группу, протекает в процессе ковалентного катализа с промежуточным образованием ацилсеринового эфира [схема (76)].



Однако существуют веские свидетельства в пользу того, что для проявления каталитической активности необходима имидазольная группа остатка гистидина в активном центре фермента. Зависимость от pH максимальных скоростей как стадии ацилирования, так и деацилирования показывает, что активность фермента пропорциональна доле основной формы группы с $pK \sim 7$, что лежит в области pK , ожидаемой для имидазольной группы. Одно это не может служить строгим доказательством, что имидазольная группа включается в активный центр; это значение pK может отражать: 1) ионизацию некоторой другой ионогенной группы, величина pK которой искажена белком; 2) имидазольную группу, протонизация которой вызывает образование каталитически неактивной конформации фермента; 3) изменение скорости определяющей стадии, а не ионизацию какой-либо группы. Более строгое свидетельство, что имидазольная группа участвует в катализе, следует из факта, что фермент необратимо инактивируется при алкилировании имидазольной группы аналогом субстрата хлоркетон VIII.

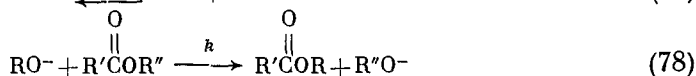
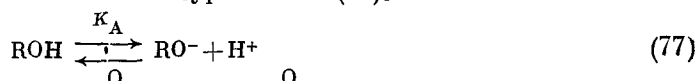


Эта молекула похожа на нормальный субстрат фермента при связывании на активном центре—в течение короткого времени хлоркетон VIII функционирует как конкурентный ингибитор фермента, а другие конкурентные ингибиторы защищают фермент от необратимой инактивации этим соединением,—однако затем происходит медленная, но специфическая реакция с имидазольной группой [79]. Поскольку нет свидетельств, что эта имидазольная группа действует как нуклеофильный катализатор, чаще всего полагают, что она выступает в качестве общесосновного катализатора, облегчая перенос протона. Известно, что имидазол действует таким образом при катализе ферментативного гидролиза эфиров [10, 80, 81]. Существует два рода свидетельств, подтверждающих такую роль имидазола в ферментативных реакциях.

Во-первых, изотопные эффекты дейтерия $k_{\text{H}_2\text{O}} / k_{\text{D}_2\text{O}}$ в реакции гидролиза промежуточных ацилферментов, циннамоилхимотрипсина и бензоилхимотрипсина лежат в диапазоне от 2 до 4, что подобно изотопным эффектам, найденным для общесосновного катализа соответствующих неферментативных

реакций [10, 81, 84]. Трудность в интерпретации таких изотопных эффектов заключаются в том, что они могут быть результатом незначительных обратимых конформационных изменений фермента, которые возникают при замене обычной воды как растворителя на окись дейтерия. Хотя удалось показать, что большие или необратимые изменения в конформации белка [84] при такой замене растворителя не происходят, возможность существования небольших или обратимых эффектов означает, что наличие изотопного эффекта дейтерия может служить лишь указанием на возможность, а не доказательством существования общесосновного катализа в ферментативной реакции.

Во-вторых, существование корреляции структура — реакция способность является свидетельством в пользу механизма общесосновного катализа [85]. В некатализируемой (или катализируемой водой) реакции аминов с эфирами скорость реакции обычно очень чувствительна к основности амина, так что зависимость $\log k$ от pK имеет наклон $\sim 0,8$. Это справедливо как для третичных аминов, так и для первичных и вторичных и означает, что удаление протона от нуклеофильного реагента в переходном состоянии не имеет существенного значения и что действие электронооттягивающих заместителей проявляется в уменьшении нуклеофильной способности за счет уменьшения электронной плотности на реакционном центре. С другой стороны, реакция спиртов с эфирами при нейтральных значениях pH обнаруживает обратную чувствительность к заместителям, а именно увеличение реакционной способности при повышении кислотности спирта. Последнее является следствием того, что активная частица — это анион спирта, и влияние электронооттягивающего заместителя сводится к увеличению равновесной концентрации аниона [уравнение (77)], что важнее, чем понижение им реакционной способности этого аниона [уравнение (78)]



Таким образом, в реакции, в которой не удаляется протон в переходном состоянии, электронооттягивающие заместители уменьшают реакционную способность, в то время как в реакции с полным удалением протона в переходном состоянии такие заместители повышают реакционную способность. Естественно, что в реакциях с промежуточной степенью переноса протона в переходном состоянии они будут давать промежуточные эффекты. Экспериментально было найдено, что для структурнородственных соединений как аминов, так и спиртов реакции с промежуточным ацилферментом (фуроилхмотрипсином) имеют слабую, или даже нулевую, чувствительность к основности нуклеофила. Это значит, что в данном случае происходит небольшое изменение заряда на атакующем атоме в переходном состоянии ферментативной реакции, и указывает на то, что в переходном состоянии протон не переносится полностью, как в спиртах, не остается без перемещения, как в аминах, а переносится частично, так что эффекты заместителя на нуклеофильную реакционную способность и на перенос протона взаимно погашаются. Это соответствует общесосновному катализу.

Подобные рассуждения, основанные на анализе корреляций структура — реакция способность, могут быть использованы для решения такого трудного вопроса, как установление природы химической группы, которая действует в качестве катализатора в ферментативной реакции. По существу проблема сводится к разрешению кинетической двусмысленности двух простейших механизмов, которые согласуются с тем экспериментально наблюдаемым фактом, что скорость реакции пропорциональна доле имидазольных групп в форме свободного основания. Как было показано выше на примере неферментативных реакций, это не значит, что ими-

дазол действует как основание при катализе реакции в обоих направлениях. Эта точка зрения обсуждалась в деталях как иллюстрация общей важной проблемы, которую только сейчас начинают принимать во внимание при интерпретации механизма ферментативной реакции.

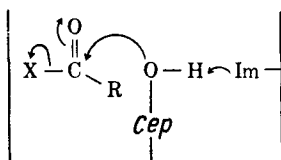
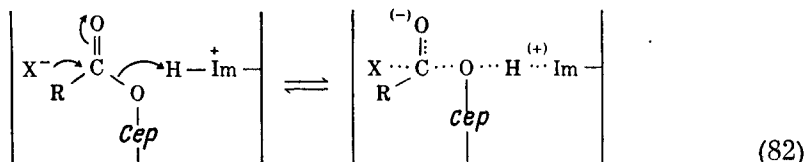
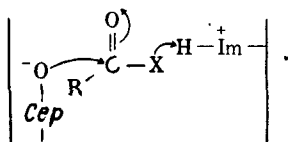
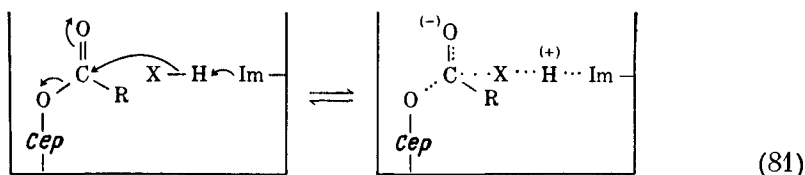
Уравнение скорости реакции ацилхимоотрипсинов с водой или некоторым другим акцептором НХ имеет вид

$$v = k \left[\text{RCO} - \text{Ser} - \text{Enz} - \text{Im} \right] [\text{HX}] = k \frac{K_{\text{ImH}^+}}{K_{\text{HX}}} \left[\text{RCO} - \text{Ser} - \text{Enz} - \text{ImH}^+ \right] [\text{X}^-], \quad (79)$$

где K_{ImH^+} и K_{HX} — соответственно константы кислотной диссоциации имидазольной группы в ферменте и в НХ. Уравнение скорости образования ацилфермента из субстрата RCOX имеет вид

$$v = k' [\text{HOCer} - \text{Enz} - \text{Im}] [\text{RCX}] = k' \frac{K_{\text{ImH}^+}}{K_{\text{CepOH}}} [\text{OCer} - \text{Enz} - \text{ImH}^+] [\text{RCX}], \quad (80)$$

где K_{CepOH} — константа кислотной диссоциации гидроксильной группы серина в активном центре фермента. Будем считать, что правильным является простейший механизм, который включает указанные реагирующие группы. В таком случае реакция деацилирования могла бы иметь место либо по механизму (81), согласно которому имидазол действует как общесосновной катализатор, облегчая удаление протона от атакующего нуклеофила, либо по механизму (82), в соответствии с которым сопряженная кислота имидазола действует на атом кислорода серина как оксикислотный катализатор и атакующим агентом является сопряженное основание нуклеофила X^- . Эти два механизма соответствуют уравнениям скорости (79) и (80) и кинетически неразличимы



Причина, по которой механизм (82) дает ту же зависимость от pH , что и механизм (81), заключается в том, что эффекты уменьшения концентрации катиона имидазолия и увеличения концентрации сопряженного основания нуклеофила с увеличением pH взаимно уравниваются при высоких значениях pH , в то время как при низких значениях pH концентрация иона имидазолия постоянна, а концентрация сопряженного основания нуклеофила увеличивается, давая наблюдаемое увеличение скорости с увеличением pH . Заметим, что в обратном направлении механизм (81) включает атаку субстрата алкоксидным ионом серина, облегчаемую общекислотным катализом катионом имидазолия отделения группы X . В соответствии с принципом микроскопической обратимости таким должен быть по схеме (81) механизм стадии ацилирования. Таким образом, если имидазол действует как катализатор удаления протона в одном направлении реакции, он должен почти во всех случаях действовать как катализатор передачи протона в другом направлении.

Аналогично механизм (82) требует, чтобы в обратном направлении имидазол действовал как общесредовой катализатор удаления протона от гидроксильной группы серина, которая атакует субстрат. И в этом случае существование специфически основного плюс общекислотного катализа в одном направлении требует, чтобы реакция подвергалась в другом направлении общесредовому катализу. Существенное различие между этими двумя механизмами заключается в том, что уравнение (81) включает перенос протона к группе и от группы X при ее отделении или атаке этой группой, в то время как уравнение (82) включает перенос протона к гидроксильной группе серина и от нее в аналогичных процессах.

Принципы, которые важны для интерпретации практически всех механизмов реакций и которые уже обсуждались на примере некоторых ферментативных реакций, заключаются, во-первых, в том, что механизм, который предполагает передачу протона в одном направлении реакции, должен практически во всех случаях включать удаление протона тем же катализатором в обратном направлении реакции, во-вторых, два или более кинетически эквивалентных механизма, которые обычно могут быть записаны для катализа, являются а priori равновероятными. Эти принципы, когда они высказываются, могут казаться очевидными, но чрезвычайно трудно усваиваются и используются на практике, поскольку энзимолог всегда испытывает искушение предпочесть тот механизм реакции, который соответствует непосредственно наличию тех частиц, которые записаны в уравнении скорости (например, имидазол и гидроксильная группа серина, а не ион имидазолия и алкоксидный ион серина).

Экспериментальное наблюдение, что реакционная способность нуклеофильных агентов при взаимодействии с ацилхимотрипсином почти не зависит от основности нуклеофила, согласуется с механизмом (81), но трудно объясняется механизмом (82). В соответствии с последним реагирующей частицей является сопряженное основание нуклеофила, участвующее в реакции без помощи частичного переноса протона. Такой механизм предполагает ионизацию нуклеофила, предшествующую скорости определяющей стадии, и должен почти определенно включать изменение заряда нуклеофила в переходном состоянии по сравнению с исходным. Механизм, включающий атаку или удаление свободных анионов аминов, маловероятен в любом случае, поскольку эти анионы термодинамически слишком нестабильны, чтобы существовать в качестве промежуточных соединений умеренно быстрых реакций в водном растворе.

Максимальная скорость гидролиза анилидов под действием химотрипсина обычно [86] (но не всегда [87]) увеличивается с введением электронодонорных заместителей в кольцо анилина (табл. 4). Это свидетельствует о том, что присоединение протона к уходящей группе, которое облегчается введением электронодонорных заместителей, ускоряет протекание реакции в боль-

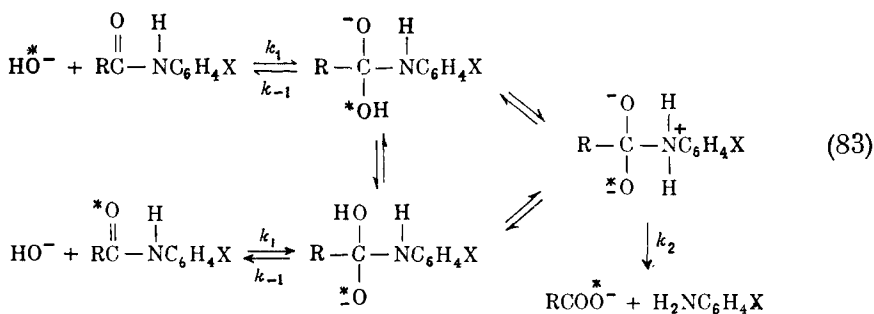
Таблица 4

Катализируемый химотрипсином гидролиз
замещенных анилидов ацетилтирозина
при pH 8,0 [86]

Замещенный анилин	$k_2 \cdot 10^2, \text{с}^{-1}$	$K_M \cdot 10^4, M$	pK анилина
<i>m</i> -Cl—	1,1	8,2	3,3
<i>n</i> -Cl—	1,4	6,7	3,8
<i>m</i> -CH ₃ O—	4,7	60	4,2
<i>n</i> -CH ₃ —	8,7	130	5,1
<i>n</i> -CH ₃ O—	21	120	5,3

шей степени, чем увеличение «покидающей» способности анилина, которое вызывается оттягиванием электронов. Увеличение скорости идет в том же направлении, что и увеличение основности анилинов, но не в той же степени. Это также соответствует механизму (81) [в обратном направлении], согласно которому в переходном состоянии необходима большая степень переноса протона на анилин, но трудно объясняется механизмом (82).

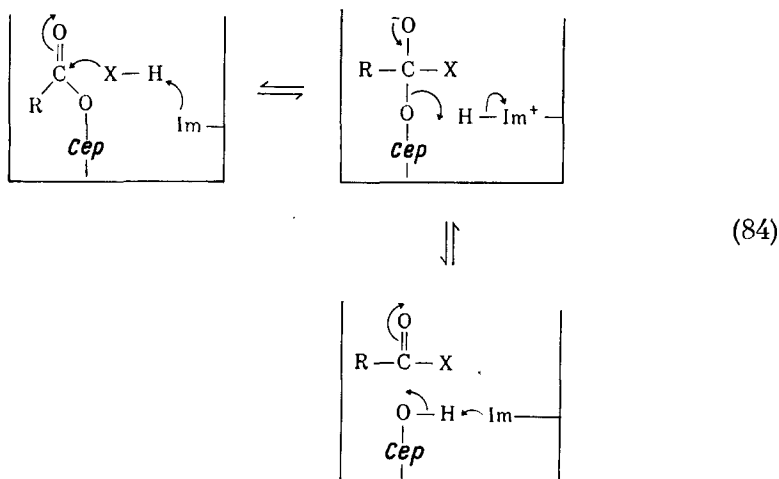
Протонирование уходящей группы имеет также важное значение при неферментативном гидролизе анилидов [88]. Скорость этой реакции почти не зависит от заместителей ($\rho = 0,1$), но обмен меченого кислорода между H₂¹⁸O и анилидом возрастает с введением в анилин электронооттягивающих заместителей.



В соответствии с механизмом (83) это можно рассматривать как облегчение электронооттягивающими заместителями первой стадии реакции, что способствует увеличению скорости обмена ¹⁸O и повышению стационарной концентрации тетраэдрического промежуточного продукта присоединения, и как торможение второй стадии вследствие уменьшения электронной плотности на азоте и степени протонирования анилина, которое необходимо для его отщепления. Положительное влияние электронодонорных заместителей, облегчающих протонизацию на заключительной стадии, может уравновесить неблагоприятный эффект тех же заместителей на первой стадии реакции. Это объясняет наблюдаемое отсутствие чувствительности скорости реакции к природе заместителей.

Механизм действия химитрипсина несомненно включает и другие каталитические факторы, помимо тех, которые представлены уравнениями (81) и (82), и единственным оправданием приведенного выше анализа механизма реакции является возможность получения этим путем более простой картины тех движущих сил, которые возникают на стадиях образования и разрушения связей. Ранее предлагали механизмы более сложные, чем пред-

ставленные схемами (81) и (82), согласно которым как удаление, так и присоединение протона на одной стадии в одном направлении реакции катализируются имидазолом; такие механизмы часто включают в качестве промежуточного соединения тетраэдрический продукт присоединения [89, 90]. Экспериментальных свидетельств, вынуждающих вводить такие механизмы, не существует, однако не исключено, что какой-нибудь механизм такого рода имеет место [схема (84)].

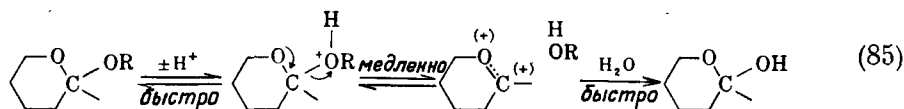


Это фактически механизм «одного столкновения», который уже обсуждался для реакции гидратации ацетальдегида. Если механизм такого рода имеет место, то вполне возможно, что кинетически значимой является лишь одна из его стадий, и в таком случае приведенный выше анализ применим для идентификации и характеристики этой стадии.

3 ЛИЗОЦИМ

Катализируемый лизоцимом гидролиз глюкозидов является наглядным примером того, как трудно четко разграничить различные типы механизмов реакции и механизмов катализа. Рентгеноструктурный анализ лизоцима и другие экспериментальные данные указывают на то, что гексозное кольцо, в котором происходит расщепление связи, находится в конформации полукресла в непосредственной близости от кислотной карбоксильной группы и карбоксилат-иона активного центра этого фермента [91, 92]. Вопрос заключается в том, каким образом взаимодействия с этими группами ведут к увеличению скорости гидролиза глюкозидной связи.

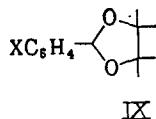
Глюкозиды и другие ацетали дают классический пример гидролиза по механизму A1, в соответствии с которым на первой стадии происходит быстрое равновесное присоединение протона, после чего следует скорость определяющая стадия отщепления спирта с образованием циклического оксонийкарбониевого иона и быстрое присоединение воды {схема (85)} [73].



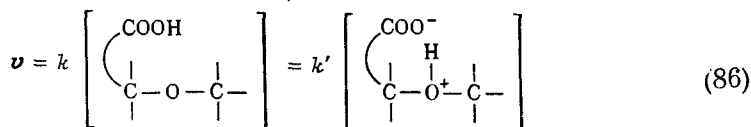
Существует большое число экспериментальных данных, которые подтверждают, что этот механизм справедлив для подавляющего большинства таких реакций, однако для некоторых соединений наблюдается постепенный пере-

ход механизма в другую категорию, что не является редкостью и для других классов реакционных механизмов. Некоторые сахара, особенно имеющие хорошие уходящие группы, такие, как галогениды или замещенные фенолятные анионы, претерпевают внутримолекулярное замещение гидроксильными, алкоксильными или амидными группами, входящими в состав молекулы сахара, или претерпевают межмолекулярное замещение в присутствии сильных нуклеофилов, таких, как тиоловые анионы [92—95]. Некоторые из этих реакций, по-видимому, протекают как прямое замещение по механизму S_N2 , другие могут быть отнесены либо к механизму S_N2 , либо к механизму, в котором образование иона карбония облегчается отрицательным зарядом и электронами определенным образом локализованной группы без заметного возникновения ковалентных структур в переходном состоянии.

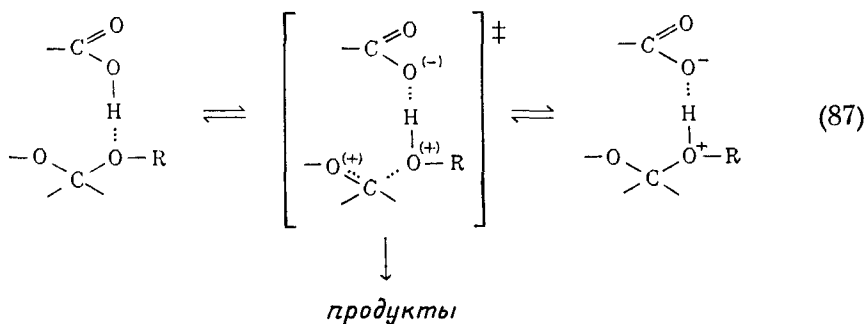
Аналогичная трудность возникает при интерпретации механизма кислотного катализа. Было показано, что гидролиз многих ацеталей и глюкозидов включает скорее специфический, а не общекислотный катализ, однако скорость гидролиза возрастает в присутствии соседней карбоксильной группы [96]; кроме того, слабый общий катализ муравьиной кислотой был обнаружен для гидролиза замещенных 2-фенил-4,4,5,5-тетраметил-1,3-диоксоланов (IX) [97].



Интерпретация увеличения скорости, которое вызывается присутствием соседней карбоксильной группы как результат общекислотного катализа, является сомнительной, поскольку повышенные скорости некоторых реакций такого типа удовлетворительно объясняются обычным A1-механизмом с учетом индукционного эффекта соседнего карбоксилат-иона [98]. Эти два механизма описываются кинетически неразличимыми уравнениями скорости

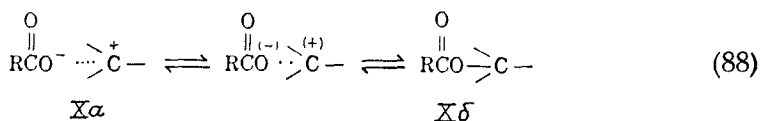


В связи с этим возникает вопрос, в чем существо различий между реакцией, катализируемой по общекислотному механизму, в которой карбоновая кислота передает протон, облегчая образование иона карбония, и специфически кислотно катализируемой реакцией, в которой карбоксилат-ион обеспечивает стабилизацию протона по существу в том же положении на уходящей группе [схема (87)]



Переходные состояния для обоих этих механизмов очень похожи, если не идентичны, поэтому требуется более детальное толкование механизмов кислотного катализа, чтобы провести четкое разграничение между этими механизмами.

Оба этих пограничных механизма пригодны для объяснения катализа лизоцимом. Группа карбоновой кислоты в активном центре фермента, по-видимому, передает протон уходящему атому кислорода. Это можно рассматривать либо как общекислотный катализ, либо как стабилизацию протонированной уходящей группы карбоксилатным ионом. Карбоксилатная группа в активном центре может ускорять реакцию или обеспечивая электростатическую стабилизацию образующегося иона карбония, или помогая замещать уходящую группу [92]. Первое предположение кажется более предпочтительным, поскольку организация атомов на активной поверхности фермента препятствует обычному S_N2 -замещению с линейным переходным состоянием, в то время как перевод субстрата в конформацию полукресла обеспечивает дополнительную стабилизацию образующегося иона карбония. Тем не менее трудно провести четкое разграничение между ионом карбония, стабилизированным соседней карбоксилатной группой [Ха, схема (88)], и напряженной связью между атомом углерода 1 и карбоксильной группой (Хб)



Возможно, каталитическая активность фермента отражает тонкий баланс между этими двумя экстремальными случаями. Свободный промежуточный ион карбония должен был бы иметь слишком высокую энергию, и это ограничивало бы протекание катализируемой реакции с необходимой скоростью, в то время как образование полной ковалентной связи с карбоксильной группой приводило бы к образованию промежуточного соединения, слишком стабильного, чтобы претерпевать быстрый завершающий гидролиз. Регулируя с высокой точностью расстояние и ориентацию между этой карбоксилатной группой и связанным субстратом, фермент реализует сразу две цели — ставит в тупик любого ученого, который хотел бы разложить механизмы всех реакций по четким категориям и достигает строгого баланса между активацией и стабилизацией, который необходим для эффективного катализа.

Е. МЕХАНИЗМ ОБЩЕГО КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО КАТАЛИЗА

Каково существо процесса ускорения реакции по общекислотному или общесновному механизму? На какой стадии и какими путями переносится протон такими катализаторами? На эти вопросы относительно легко можно ответить в общих чертах, но трудно ответить детально с четкими экспериментальными доказательствами.

Прежде всего важно еще раз провести различие между реакциями, в которых перенос протона сам определяет основной энергетический барьер реакции, и реакциями, в которых перенос протона хотя и имеет место, но основной энергетический барьер связан с некоторой другой стадией реакции. Наиболее обычным примером первого класса реакций как в химии, так и в биохимии является процесс удаления протона от углеродной кислоты (карбокислоты), например енолизация кетона. Наиболее известными примерами второго класса являются реакции карбонильной или иминной группы,

которые включают присоединение воды и азотистых оснований к карбонильным соединениям, эфирам, амидам, а также многие реакции присоединения к основаниям Шиффа.

1. ПЕРЕНОС ПРОТОНА К АТОМУ И ОТ АТОМА УГЛЕРОДА

Первый класс реакций, в которых перенос протона сам обеспечивает основной энергетический барьер, во многих отношениях понять легче. Общепринято, что основной катализ этих реакций включает непосредственное удаление протона от атома углерода [схема (89)], и весьма вероятно, что общекислотный катализ включает общесредовой катализ удаления протона от сопряженной кислоты субстрата, а не кинетически эквивалентный простой



общекислотный катализ [уравнение (90) и (91)].



$$v = k[\text{H}^+\text{B}][\text{H}_3\text{CC}=\text{O}] = k'[\text{B}][\text{H}_3\text{CC}=\text{OH}^+] \quad (91)$$

Белл с сотрудниками показал, что с уменьшением кислотности карбоокислоты и с увеличением трудности удаления протона реакция обнаруживает повышенную чувствительность к основности катализатора, т. е. с уменьшением кислотности карбоокислоты увеличивается коэффициент Брэнстеда β (табл. 5).

Таблица 5

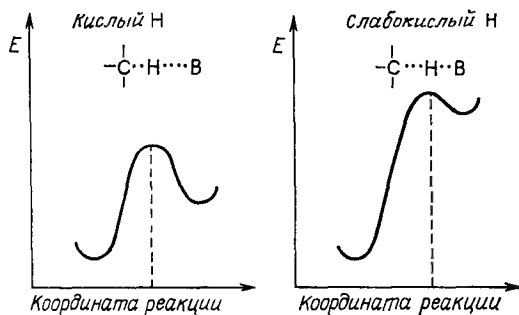
Влияние кислотности карбоокислоты на чувствительность к общесредовому катализу^а

Карбоокислота	$\log k_A$ ^б	pK_s	β
CH_3COCH_3	-8,56	20,0	0,88
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$	-7,85	18,7	0,89
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{Cl}$	-5,29	16,5	0,82
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{Br}$	-5,03	16,1	0,82
$\text{CH}_3\text{COCHCl}_2$	-3,78	14,9	0,82
$\text{CH}_2\text{COCHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ └─(CH ₂) ₃ ─┐	-1,76	13,1	0,64
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	-1,06	10,5	0,59
$\text{CH}_2\text{COCHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ └─(CH ₂) ₄ ─┐	-0,60	10,0	0,58
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COC}_6\text{H}_5$	-0,45	9,7	0,52
$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$	-0,24	9,3	0,48
$\text{CH}_3\text{COCHBrCOCH}_3$	+0,26	8,3	0,42

^а [1, стр. 172].

^б Для оснований с pK 4,0 л/моль·с.

Этот результат можно было бы предвидеть из обсуждения кривых потенциальной энергии для реакции. В соответствии с постулатом Хаммонда переходное состояние для более трудно протекающей реакции достигается дальше вдоль координаты реакции, так что происходит относительно глубокое разрушение связи углерод — водород и образование связи с основанием (рис. 12). Более полное образование связи с основанием предполагает, что энергия переходного состояния будет высокочувствительна к основности основания, что приводит к большим значениям β .



Р и с. 12. Переходное состояние реакции удаления протона от слабой карбокислоты возникает дальше вдоль координаты реакции, чем для реакции удаления протона от более сильной карбокислоты.

Константы скорости удаления протона от ацетилацетона обнаруживают уменьшение β с увеличением силы основания [16]. Это существенно отличается от реакций переноса протона между атомами кислорода, азота и серы, энергетические барьеры которых много ниже и которые в широком диапазоне основности имеют значения $\beta = 0$ или 1,0, ожидаемые для простой диффузионно контролируемой реакции. Это также отличается от реакций второго класса, обсуждаемых ниже, которые часто обнаруживают малые изменения α или β в широком диапазоне кислотности или основности.

2. РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ПРОТОНА К АТОМАМ И ОТ АТОМОВ КИСЛОРОДА, АЗОТА И СЕРЫ

Трудности в интерпретации детального механизма реакций второго класса возникают вследствие того, что основной энергетический барьер реакции связан с взаимодействием атомов, отличных от тех, которые непосредственно участвуют в переносе протона, так что при полном описании поверхности потенциальной энергии реакции, такой, как катализируемое кислотой присоединение нуклеофила к карбонильной группе [схема (92)],

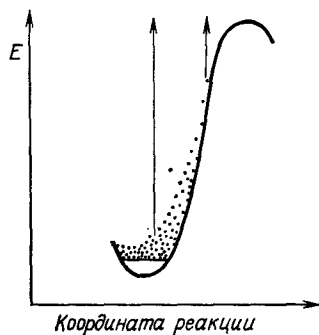


необходимо учитывать почти одновременное движение пяти или более атомов и, кроме того, изменения в окружающих молекулах растворителя. Физико-химики обычно пасуют перед возникающими трудностями, когда они сталкиваются с такой проблемой, и любое детальное обсуждение механизма этого важного класса реакций в настоящее время является упрощенным и качественным. При обсуждении этой проблемы постоянно возникает вопрос, каково то время, которое требуется для достижения переходного состояния энергетически самой трудной стадии реакции, и достаточно ли оно, чтобы протоны и молекулы растворителя достигли низкоэнергетических равновес-

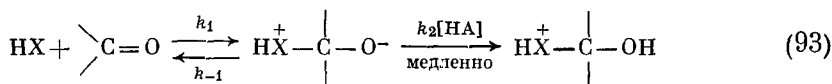
ных состояний. Ответить на это помог бы другой, в основном семантический и часто повторяемый вопрос: в какой степени эти реакции являются «согласованными»? Однако в настоящее время однозначного ответа, по-видимому, нет.

Вопрос о том, сколько времени необходимо реагирующей молекуле или молекулярной паре для образования переходного состояния, можно поставить следующим образом: что вероятнее то, что переходное состояние будет достигаться небольшим энергетическим скачком, претерпеваемым одной из немногих реагирующих частиц, которые уже почти достигли энергии переходного состояния, или то, что переходное состояние достигается очень редким большим энергетическим скачком одной из многих реагирующих частиц, которые находятся на низком энергетическом уровне (рис. 13)? Если переходное состояние достигается серией малых энергетических скачков, структура промежуточных состояний будет отличаться от структуры основного состояния, и весьма вероятно, что перенос протона будет происходить в системе, которая близка к равновесному состоянию. Если переходное состояние достигается быстро, может оказаться, что для переноса протона недостаточно времени, если только этот перенос не произойдет согласованно с перемещением всех составных частей активированного комплекса (включая сольватирующие молекулы). Скорость, с которой перенос протона может происходить внутри реагирующего комплекса, точно неизвестна, но она определенно выше, чем скорость диффузии, и лежит, вероятно, в интервале $10^{-11} \dots 10^{-13}$ с. Скорость реорганизации молекул растворителя, обеспечивающих оптимальную сольватацию, по-видимому, несколько меньше, чем скорость переноса протона. Из-за отсутствия четких ответов на эти вопросы в настоящее время можно только наметить все возможные варианты. Это удобно сделать на примере конкретной реакции, в качестве которой выберем присоединение нуклеофильного реагента к карбонильной группе, катализируемое по общекислотному механизму [схема (92)].

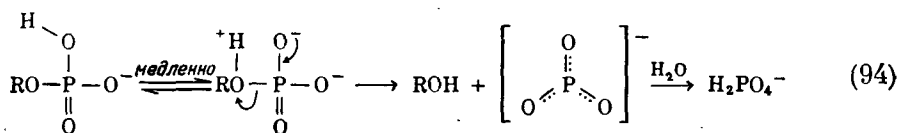
а) Первая возможность заключается в том, что скорость определяющей стадией является перенос протона и реакция не является согласованной. Для этого случая необходимо, чтобы константа скорости k_{-1} схемы (93) была бы больше, чем $k_2[\text{HA}]$, т. е. продукт первой стадии должен быть в равновесии с исходными веществами. В некотором смысле аналогичная ситуация



Р и с. 13. Более ли вероятно, что переходное состояние образуется большим энергетическим скачком одной из многих молекул реагирующих веществ в низкоэнергетическом состоянии или малым энергетическим скачком одной из очень немногих реагирующих молекул в высокоэнергетическом состоянии?



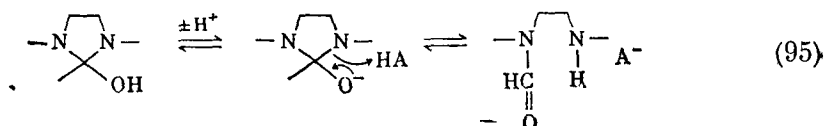
постулируется для гидролиза моноанионов фосфорных эфиров с очень хорошими уходящими группами {схема (94)} [99]



Механизм такого типа требует, чтобы перенос протона происходил со скоростью, которая меньше, чем скорость образования и разрушения ковалентной связи между двумя более тяжелыми атомами. Эта ситуация не так маловероятна, как может показаться с первого взгляда, поскольку, несмотря на то что константы скорости для таких реакций переноса протона обычно равны диффузионно контролируемому пределу, скорость в данном экспериментальном случае может быть относительно низкой вследствие низкой концентрации одной из реагирующих частиц или неблагоприятной равновесной стадии, предшествующей переносу протона.

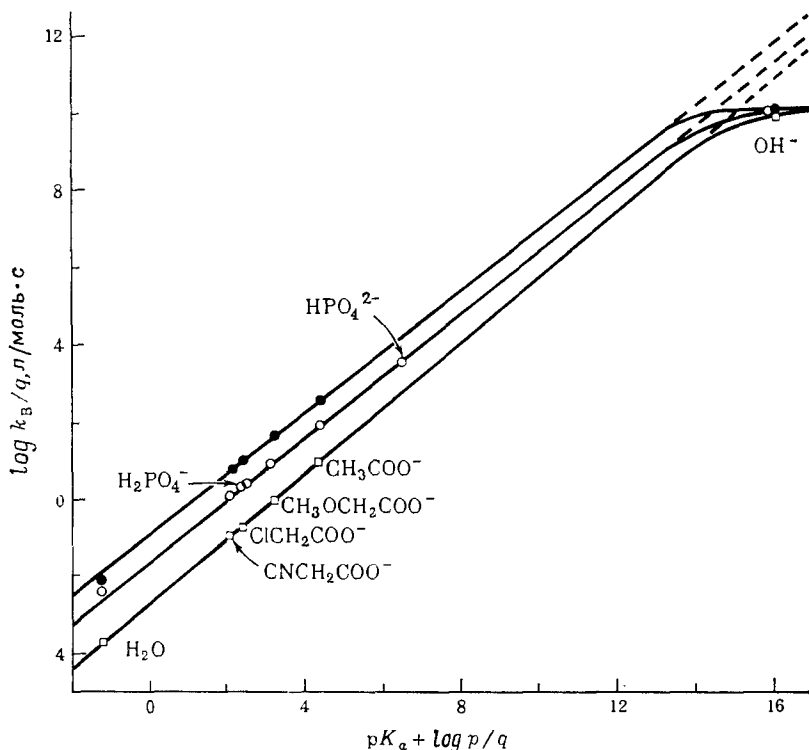
Существуют два экспериментальных критерия для распознавания механизма такого рода. Во-первых, константа скорости должна быть равна диффузионно контролируемому пределу 10^{10} л/моль·с. В случае если концентрации частиц, которые реагируют с диффузионно контролируемой скоростью, неизвестны, константу скорости этой реакции вычислить невозможно. По всей вероятности, это будет в случае разложения тетраэдрического промежуточного продукта присоединения в реакциях переноса ацила, которое происходит в результате диффузионно контролируемой реакции с молекулой кислоты или основания в растворе. Во-вторых, значения α или β для таких реакций должны быть равными 0 или 1,0. Если перенос протона происходит в термодинамически благоприятном направлении, константа скорости переноса протона будет контролироваться диффузией и не будет зависеть от кислотности или основности реагирующих частиц (α , $\beta \sim 0$). Если перенос протона происходит в термодинамически неблагоприятном направлении, константа скорости будет приблизительно равна $10^{10}/K_{\text{равн}}$ [уравнение (64)], т. е. скорость реакции будет прямо зависеть от силы кислоты или основания, так что α или β должны равняться 1,0. Значения α или β , равные 0 или 1,0, обычно означают, что общий кислотно-основной катализ обнаружить невозможно, но такой катализ может быть обнаружен в реакциях такого же типа, если наклон прямой Брэнстеда меняется от 1,0 до 0 при изменении кислотности и основности катализатора [16]. Это, по-видимому, приводит к кажущемуся отрицательному отклонению точек для катализа протоном, водой или ионом гидроксила, так что катализ другими кислотами или основаниями становится заметным.

Возможный пример такой ситуации был обнаружен в катализируемой по общеокислотному механизму реакции переноса ацетила от серы к азоту в S-ацетилмеркаптоэтиламине, которая имеет значение α , экспериментально неотличимое от 0 для катализа карбоновыми кислотами и моноанионом фосфата [100]. Существует и другое свидетельство в пользу того, что стадия переноса протона должна быть скоростью определяющей в этой реакции (гл. 10, разд. Б,10). Возможное объяснение отрицательного отклонения каталитической константы для воды в катализируемом по общесновному механизму разложении тетраэдрического промежуточного продукта присоединения в реакции гидролиза формамидиния заключается в том, что эта реакция фактически представляет собой передачу протона сопряженному основанию промежуточного продукта и что скорость перехода сольватированного протона достигла диффузионно контролируемого предела {схема (95), $\text{HA} = \text{H}_3\text{O}^+$ } [36]



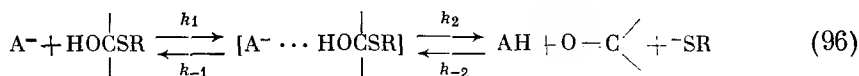
Скорость катализируемого ионом гидроксила разложения полутиоацеталей, образованных из кислых тиолов, определяется скоростью диффузии

реагирующих веществ, но протекает не по механизму (93). Эта реакция подвергается общесловному катализу более слабыми основаниями, чем ион гидроксидов со значением β , равным 0,8. Тот факт, что значение β равно 0,8, а не 1,0, означает, что перенос протона не является единственным процессом, происходящим на скорость определяющей стадии. Механизм реакции представлен схемой (96), в соответствии с которой вторая стадия представляет собой «согласованное» катализируемое общим основанием разложение



Р и с. 14. Зависимости Брэнстеда для реакции разложения полутиоацеталей, образованных из ацетальдегида и бензотиола (□), тиоуксусной кислоты (○), *n*-нитробензотиола (●) при 25 °C [27].

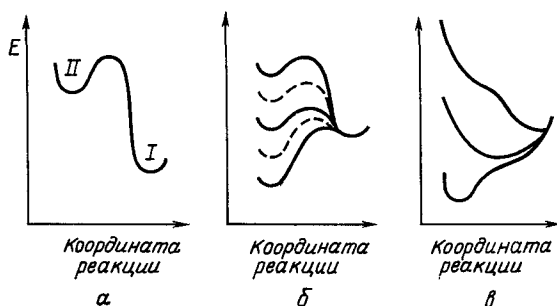
полутиоацетала. Ион гидроксидов катализирует реакцию с константой скорости, близкой к диффузионно контролируемому пределу. Эта реакция представляет особый случай того же механизма, в котором скорость определяющей стадией является диффузия реагирующих частиц (k_1)



В этом случае на кривой зависимости Брэнстеда наблюдается диффузионно контролируемый предел, и точка для иона гидроксидов показывает отрицательное отклонение от линии, которой подчиняются другие основания (рис. 14). Эта реакция представляет собой хороший пример превращения, в котором образование и разрушение ковалентных связей с углеродом могут протекать быстрее, чем диффузионно контролируемая стадия. Тот факт, что диффузионно контролируемая стадия является медленной, означает, что в обратной катализируемой водой реакции [схема (96), $\text{AH} = \text{H}_2\text{O}$] анион тиола будет несколько раз претерпевать обратимое присоединение к карбонильной группе,

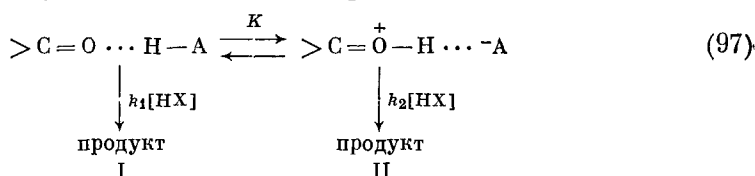
прежде чем промежуточный продукт разделится с образованием полуацетала и иона гидроксила [27].

б) Скорость определяющей стадией является образование связи $X - C$, но переходное состояние образуется достаточно быстро, так что протон не успевает изменить свое положение в соответствии с изменяющейся основностью карбонильного кислорода, а катализатор облегчает реакцию за счет

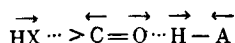


Р и с. 15. Гипотетические диаграммы движения протона в процессе протекания общекислотно катализируемого присоединения HX к карбонильной группе.

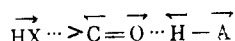
образования водородной связи с карбонильной группой. Этот случай представлен схемой (97), а кривая потенциальной энергии для протона как функция положения между A^- и O показана на рис. 15, а.



Связанный водородной связью протон может быть либо ближе к A^- (I), либо к атому кислорода карбонильной группы (II). Частицы I будут реагировать с константой скорости k_1 , которая больше, чем константа скорости для свободного карбонильного соединения. Частицы II будут реагировать с очень высокой константой скорости k_2 , но доля превращения, происходящего по этому пути, не может быть большой вследствие низкой концентрации частиц II. Изотопный эффект дейтерия и наклон зависимости Брэнстеда α для этой реакции будут функциями констант равновесия образования комплексов с водородными связями, константы равновесия K и относительных величин k_1 и k_2 . Переходное состояние может быть достигнуто при движении протона от карбонильной группы



или к карбонильной группе

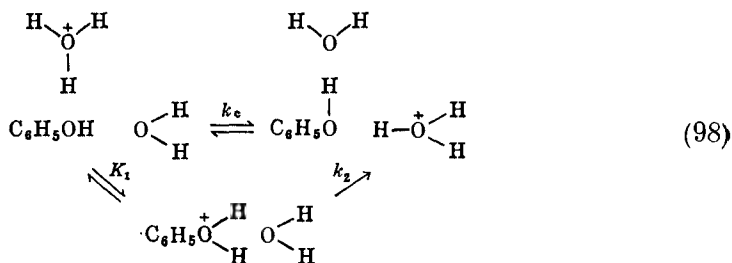


Следует ожидать, что в последнем случае обеспечивается более низкоэнергетическое переходное состояние для атаки по углероду, и чем большую роль играет этот процесс во всей реакции, тем более согласованным можно считать ее механизм.

в) Превращение реагирующих веществ из основного в переходное состояние является медленным по сравнению со скоростью переноса протона.

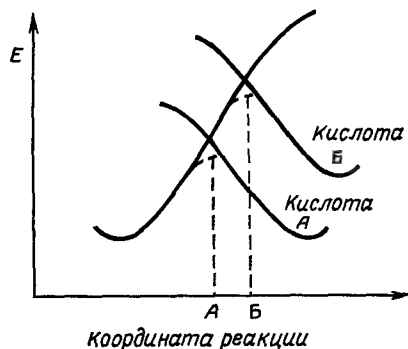
поэтому положение правого и левого минимумов на кривой потенциальной энергии для связанного водородной связью протона будет меняться в зависимости от места на координате реакции, занимаемого системой в целом между реагирующими веществами, переходным состоянием и продуктами реакции. В начале (рис. 15, б) самое низкоэнергетическое положение протона находится вблизи A^- , но в процессе протекания реакции карбонильный атом кислорода становится более основным, так что энергия связывания протона с этим атомом становится равной и в конечном итоге более значительной, чем энергия связывания с A^- . Энергетический барьер для переноса протона, который вначале велик, будет уменьшаться в процессе достижения переходного состояния и станет относительно малым в момент переноса протона. Происходит ли перескок протона на атом кислорода одновременно с образованием переходного состояния для $X-C$ -связи,—вопрос спорный, но тот факт, что протон непосредственно перед достижением переходного состояния находится в положении, отличном от положения его в исходных соединениях, означает, что реакция является в известном смысле согласованной. Изотопные эффекты дейтерия для этого типа реакции часто малы, и это указывает на то, что процесс переноса протона не является скоростью определяющей стадией в обычном смысле, т. е. протон в переходном состоянии не должен быть на вершине потенциального барьера [7, 101].

г) Скорость достижения переходного состояния является также медленной по сравнению со скоростью переноса протона, но в этом случае нет существенного барьера для переноса протона в переходном состоянии. Это можно наблюдать в том случае, если водородная связь с участием протона является достаточно короткой и прочной, так что на потенциальной кривой переноса протона существует единственный минимум, или в случае, когда перенос протона происходит *через* узкий потенциальный барьер благодаря туннельному эффекту [102]. Положение энергетического минимума для протона между донором и акцептором может перемещаться с течением реакции, так что в процессе реакции протон ни разу не пересекает заметного энергетического барьера (рис. 15, в) [103]. Как уже несколько раз отмечалось, свободная энергия активации переноса протона в термодинамически благоприятном направлении очень мала, поскольку перенос протона может протекать быстрее, чем взаимная диффузия реагентов. Детальные вычисления потенциальной поверхности для переноса протона от соляной кислоты к молекуле аммиака показывают, что для этой реакции нет энергии активации [104]. Возможным примером согласованной природы реакций этого типа является катализируемый кислотами перенос протона между фенолом и водой {схема (98)} [105].



Константа скорости всего процесса равна $1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Так как сопряженная кислота фенола термодинамически нестабильна (K_1), она не может выступать в качестве промежуточного соединения процесса, поскольку последующая реакция образования продуктов (k_2) даже при сверхвысоком зна-

ОН-иона. Нижний механизм описывает катализ ионом водорода, который предполагает образование в качестве промежуточного продукта нестабильного оксониевого иона XI (pK около -2). При pH 7 стандартные свободные энергии образования любого из этих промежуточных соединений лежат в интервале 9500—12 600 кал/моль (45 600—60 500 Дж/моль), что является слишком большой величиной для образования даже таких реакционно-способных частиц. Средний механизм представляет собой общекислотный катализ и включает передачу протона катализатором в прямом направлении реакции и удаление протона сопряженным основанием катализатора в обратном направлении. Этот путь реакции не требует образования слишком нестабильных промежуточных продуктов и все же позволяет реакции протекать с необходимыми переносами протона. Энергия стабилизации переходного состояния, которая обеспечивается общекислотным катализатором есть разность между энергиями переходного состояния для среднего пути реакции и энергией переходного состояния для некаталитического верхнего или нижнего пути реакции. Эта стабилизация является сложным результатом воздействия катализатора на образование и разрушение связи углерод — кислород, переноса протона в переходном состоянии и силы катализатора как кислоты. Количественные соотношения, характеризующие эти эффекты, могут быть получены эмпирически при использовании корреляций структура — реакционная способность. Однако достаточно полного рассмотрения этой сложной проблемы в настоящее время пока нет.



Р и с. 16. Диаграмма, которая показывает, что переходное состояние для переноса протона может возникать на различных расстояниях вдоль координаты реакции для кислот различной силы при небольшом изменении или вообще без изменения α .

В этой связи необходимо заметить, что молекулярная интерпретация коэффициента Брэнстеда для этого типа реакций является непростой задачей. Часто принимают, что экспериментальное значение коэффициента Брэнстеда, который можно рассматривать как меру относительной стабилизации переходного состояния кислотами различной силы, можно интерпретировать и как меру «количества» переноса протона в переходном состоянии. Такая экстраполяция лишь весьма приближительна, и множество факторов, которые могут влиять на стабилизацию переходного состояния и тем не менее не могут быть учтены, заставляет избегать таких слишком прямолинейных интерпретаций. Действительно, можно ожидать, что будет наблюдаться различная доля переноса протона в переходном состоянии для кислот различной силы (рис. 16), несмотря на тот факт, что значение α для некоторых реакций остается фактически постоянным в широком диапазоне кислотности [116, 107]. Коэффициент Брэнстеда лучше всего интерпретировать эмпирически как степень стабилизации переходного состояния заместителями кислоты или основания по сравнению со стабилизацией этими же заместителями продукта полного переноса протона. Поскольку перенос протона вызывает изменение заряда кислоты или основания, коэффициент Брэнстеда можно рассматривать также как приближительную меру изменения заряда протонодонорного или протоноакцепторного атома в переходном состоянии.

Другая причина, по которой стабилизация переходного состояния неэквивалентна простому образованию водородной связи при равновесии, связана с особенностями образования переходного состояния. Стабильность обычной водородной связи характеризуется разностью между свободной энергией разделенных молекул кислоты и основания, например уксусной кислоты

и иона ацетата, и свободной энергией пары, связанной водородной связью. В воде эта величина очень мала, и можно даже сомневаться в существовании водородных связей между малыми сольватированными молекулами. Условия достижения переходного состояния, например реакции, представленной схемой (100), идущей справа налево, существенно иные. Здесь исходят из молекулы воды, которая меняет свою кислотность при достижении переходного состояния до кислотности иона оксония, и стабилизация может быть следствием образования прочной водородной связи с такой «кислой» частицей. Такая стабилизация невозможна при равновесных условиях в воде. Если перемещение протона происходит одновременно с образованием переходного состояния, то большую часть энергии стабилизации можно рассматривать как результат взаимодействия протона образующегося оксониевого иона и возникающей основной частицы. Таким образом, уменьшение энергии переходного состояния в результате общекислотного катализа может быть прямым следствием переноса протона и быть существенно больше, чем энергия обычной межмолекулярной водородной связи в воде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bell R. P., *The Proton in Chemistry*, Cornell University Press, Itaca, N.Y., 1959.
2. Jencks W. P., Carriuolo J., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1272, 1280 (1959).
3. Bishop D., Laidler K. J., *J. Chem. Phys.*, **42**, 1688 (1965).
4. Fife T. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4597 (1965).
5. Covitz F., Westheimer F. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1773 (1963).
6. Schowen R. L., Latham K. S., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4677 (1967).
7. Swain C. G., Kuhn D. A., Schowen R. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1553 (1965).
8. Jencks W. P., Givot I., Satterthwait A., unpublished experiments.
9. Gascoigne I. M., Radda G. K., *Biochem. Biophys. Acta*, **131**, 498 (1967).
10. Jencks W. P., Carriuolo J., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1743 (1961).
11. а) Benson S. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5151 (1958);
б) Bishop D., Laidler K. J., *J. Chem. Phys.* **42**, 1688 (1965);
в) Bell R. P., Evans P. G., *Proc. Roy. Soc., (London)* **291A**, 297 (1966).
12. Bell R. P., *Acid-Base Catalysis*, Oxford University Press, London, 1941, p. 94.
13. Sander E., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3817 (1968).
14. Bell R. P., Higginson W. C. E., *Proc. Roy. Soc., (London)*, **197A**, 141 (1949).
15. Bell R. P., *The Proton in Chemistry*, Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1959, Chap X, p. 155.
16. Eigen M., *Angew. Chem. Intern. Ed. Eng.*, **3**, 1 (1964).
17. Hine J., *J. Org. Chem.*, **31**, 1236 (1966).
18. Cordes E. H., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4319 (1962).
19. Trotman-Dickenson A. F., *J. Chem. Soc.*, 1949, 1293; Hall H. K., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5441 (1957); Folkers E., Runquist O., *J. Org. Chem.*, **29**, 830 (1964); Condon F. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4481, 4485 (1965).
20. Bissot T. C., Parry R. W., Campbell D. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 796 (1957); Hinman R. L., *J. Org. Chem.*, **23**, 1587 (1958).
21. Kallen R. G., Jencks W. P., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5864 (1966).
22. Bell R. P., Wilson G. L., *Trans. Faraday Soc.*, **46**, 407 (1950).
23. Edwards J. O., Morrison G. C., Ross V. F., Schultz J. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 266 (1955); Bell R. P., Jones R. B., Edwards J. O., as quoted Bell, Evans [11b]; Edsall J. T., Wyman J., *Biophysical Chemistry*, **1**, Academic Press, Inc., New York, 1958, p. 588.
24. Sharma M. M., Danckwerts P. V., *Trans. Faraday Soc.*, **59**, 386 (1963).
25. Coleman J. E., *J. Biol. Chem.*, **242**, 5212 (1967).
26. Cordes E. H., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2843 (1963).
27. Barnett R., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5963 (1967).
28. Reimann J. E., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3973 (1966).
29. Koehler K., Sandstrom W., Cordes E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2413 (1964).
30. Yates K., Stewart R., *Can. J. Chem.*, **37**, 664 (1959).
31. Eigen M., De Maeyer L., *Z. Electrochem.*, **59**, 986 (1955).
32. Becker B., Davidson A. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 159 (1963).
33. Kallen R. G., Jencks W. P., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5851 (1966).
34. Wheeler O. H., Levy E. M., *Can. J. Chem.*, **37**, 1727 (1959); Becker B., Davidson A. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 159 (1963).
35. Dolman D., Stewart R., *Can. J. Chem.*, **45**, 911 (1967).
36. Robinson D. R., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7088 (1967).

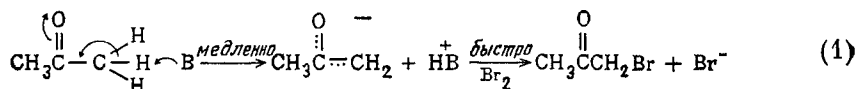
37. Kreevoy M. M., in (Weissberger A., ed.) «Technique of Organic Chemistry», 2d ed., vol. VIII, part II, Interscience Publishers, Inc., New York, 1963, p. 1399.
38. Gerstein J., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 86, 4655 (1964).
39. Evans M. G., Polanyi M., Trans. Faraday Soc., 34, 11 (1938); Leffler J. E., Science, 117, 340 (1953); Hammond G. S., J. Am. Chem. Soc., 77, 334 (1955).
40. Miller S. I., J. Am. Chem. Soc., 81, 101 (1959); Wilputte-Steinert L., Fierens P. J. C., Hannaert H., Bull. Soc. Chim. Belges, 64, 628 (1955).
41. Leffler J., Grunwald E., Rates and Equilibria of Organic Reactions, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1963.
42. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 4319 (1962).
43. Swain C. G., Scott C. B., J. Am. Chem. Soc., 75, 141 (1953).
44. Lienhard G. E., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 88, 3982 (1966).
45. Stewart T. D., Kung H. P., J. Am. Chem. Soc., 55, 4813 (1933).
46. Svirbely W. J., Roth J. F., J. Am. Chem. Soc., 75, 3106 (1953).
47. Stewart T. D., Donnally L. H., J. Am. Chem. Soc., 54, 2333, 3559 (1932).
48. Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 81, 475 (1959).
49. do Amaral L., Sandstrom W. A., Cordes E. H., J. Am. Chem. Soc., 88, 2225 (1966).
50. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 832 (1962).
51. Conant J. B., Bartlett P. D., J. Am. Chem. Soc. 54, 2881 (1932).
52. Bell R. P., Rand M. H., Wynne-Jones K. M. A. Trans. Faraday Soc., 52, 1093 (1956).
53. Swain C. G., Worosz J. C., Tetrahedron Letters, 36, 3199 (1965).
54. Jencks W. P., Progr. Phys. Org. Chem., 2, 63 (1964).
55. Lowry T. M., Faulkner I. J., J. Chem. Soc., 1925, 2883; Lowry T. M., ibid., 1927, 2554.
56. Swain C. G., Brown J. F., Jr., J. Am. Chem. Soc., 74, 2534, 2538 (1952).
57. Pocker Y., Chem. Ind. (London), 1960, 968; Eastham A. M., Blackall E. L., Latremouille G. A., J. Am. Chem. Soc., 77, 2182 (1955); Blackall E. L., Eastham A. M., ibid., 77, 2184 (1955).
58. Winstein S., Smith S., Darwish D., J. Am. Chem. Soc., 81, 5511 (1959).
59. Dawson H. M., Spivey E., J. Chem. Soc., 1930, 2180.
60. Bell R. P., Jones P., J. Chem. Soc., 1953, 88.
61. Rossotti F. J. C., Nature, 188, 936 (1960).
62. Bell R. P., McCoubrey J. C., Proc. Roy. Soc. (London), 234 A, 192 (1956).
63. Banks B. E. C., J. Chem. Soc., 1962, 63.
64. Ossorio R. P., Hughes E. D., J. Chem. Soc., 1952, 426.
65. Cram D. J., Guthrie R. D., J. Am. Chem. Soc., 87, 397 (1965); 88, 5760 (1966).
66. Cram D. J., Willey F., Fisher H. P., Relles H. M., Scott D. A., J. Am. Chem. Soc., 88, 2759 (1966).
67. Denney D. B., Greenbaum M. A., J. Am. Chem. Soc., 79, 3701 (1957).
68. Rose I. A., O'Connell E. L., J. Biol. Chem., 236, 3086 (1961); Rose I. A., Brookhaven Symp. Biol., 15, 293 (1962).
69. Wang S-F., Kawahara F. S., Talalay P., J. Biol. Chem., 238 576 (1963).
70. Ergen M., Hammes G. G., Kustin K., J. Am. Chem. Soc., 82, 3482 (1960).
71. Baich A., Wolfe R. G., Reithel F. J., J. Biol. Chem., 235, 3130 (1960).
72. Edsall J. T., Wyman J., Biophysical Chemistry, Academic Press, Inc., New York, 1958, p. 452, 464.
73. Cordes E. H., Progr. Phys. Org. Chem., 4, 1 (1967).
74. Bell R. P., Acid-Base Catalysis, Chap. 5, Oxford University Press, London, 1941.
75. Eigen M., Discussions Faraday Soc., 39, 7 (1965).
76. Lienhard G. E., Anderson F. H., J. Org. Chem., 32, 2229 (1967); Pocker Y., Meany J. E., J. Phys. Chem., 71, 3113 (1967).
77. Cunningham B. A., Schmir G. L., J. Am. Chem. Soc., 88, 551 (1966).
78. Rose I. A., O'Connell E. L., J. Biol. Chem., 242, 1870 (1967).
79. Ong E. B., Shaw E., Schoellmann G., J. Am. Chem. Soc., 86, 1271 (1964).
80. Cunningham L. W., Science, 125, 1145 (1957).
81. Anderson B. M., Cordes E. H., Jencks W. P., J. Biol. Chem., 236, 455 (1961).
82. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Am. Chem. Soc., 83, 1743 (1961).
83. Caplow M., Jencks W. P., Biochemistry, 1, 883 (1962).
84. Bender M. L., Hamilton G. A., J. Am. Chem. Soc., 84, 2570 (1962); Bender M. L., Clement G. E., Kézdy F. J., Heck H. d'A., ibid., 86, 3680 (1964).
85. Inward P. W., Jencks W. P., J. Biol. Chem., 240, 1986 (1965).
86. Inagami T., York S. S., Patchornik A., J. Am. Chem. Soc., 87, 126 (1965).
87. Bundy H. F., Moore C. L., Biochemistry, 5, 808 (1966).
88. Bender M. L., Thomas R. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 4183 (1961).
89. Bender M. L., Kézdy F. J., J. Am. Chem. Soc., 86, 3704 (1964).
90. Bruice T. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47, 1924 (1961).
91. Phillips D. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 484 (1967).
92. Vernon C. A., Proc. Roy. Soc. (London), 167 B, 389 (1967).
93. Ballou C. E., Advan. Carbohydrate Chem., 9, 59 (1954).
94. Piszkiwicz D., Bruice T. C., J. Am. Chem. Soc., 89, 6237 (1967).

95. *Capon B., Thacker D.*, J. Am. Chem. Soc., 87, 4199 (1965).
96. *Capon B.*, Tetrahedron Letters, 14, 911 (1963); *Capon B.; Smith M. C.*, Chem. Comm., 1965, 523.
97. *Fife T. H.*, J. Am. Chem. Soc., 89, 3228 (1967).
98. *Bruice T. C., Piszkiwicz D.*, J. Am. Chem. Soc., 89, 3568 (1967).
99. *Kirby A. J., Varvoglis A. G.*, J. Am. Chem. Soc., 89, 415 (1967).
100. *Barnett R., Jencks W. P.*, J. Am. Chem. Soc., 90, 4199 (1968).
101. *Bunton C. A., Shiner V. J., Jr.*, J. Am. Chem. Soc., 83, 42, 3207, 3214 (1961).
102. *Weiss J. J.*, J. Chem. Phys., 41, 1120 (1964).
103. *Kreevoy M. M.*, quoted in *Cordes* [73].
104. *Clementi E.*, J. Chem. Phys., 43, 3851 (1967).
105. *Grunwald E., Puar M. S.*, J. Phys. Chem., 71, 1842 (1967).
106. *Grunwald E., Loewenstein A., Meiboom S.*, J. Chem. Phys., 27, 630 (1957); *Loewenstein A., Meiboom S.*, ibid., p. 1067; *Jencks W. P., Carriuolo J.*, J. Am. Chem. Soc., 82, 675 (1960).

ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ*

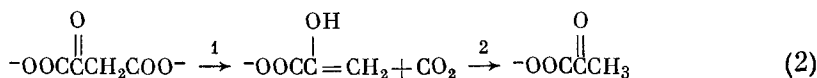
А. ВВЕДЕНИЕ И ТЕОРИЯ

При исследовании механизмов реакций часто отмечают тот факт, что скорость реакции, при которой переносится дейтерий, в несколько раз меньше, чем скорость реакции, при которой переносится водород**. Так, скорость определяющая стадия бромирования ацетона при очень низких концентрациях брома представляет собой катализируемое основанием удаление протона с образованием енолятного иона, который быстро реагирует с бромом [схема (1)]



Как эта реакция, так и реакция прямого обмена атомов водорода ацетона с растворителем протекают в 6—10 раз медленнее, если водород заменить на дейтерий [2].

Дейтериевый (или тритиевый) изотопный эффект, возникающий из-за различия нулевых уровней энергии валентных колебаний связей с водородом и дейтерием, наиболее часто используют как свидетельство существования или отсутствия процесса переноса протона в скорость определяющей стадии. Совершенно очевидно, что исследование дейтериевого изотопного эффекта чрезвычайно полезно в диагностике механизма реакции, но детальная интерпретация таких эффектов сложнее, чем обычно полагают, и должна проводиться с осторожностью. Изотопные эффекты с более тяжелыми атомами, чем водород, менее изучены, так как вследствие малого различия в массах эти эффекты невелики, однако и они открывают большие возможности для исследования механизмов как химических, так и ферментативных реакций, хотя и не поддаются такой детальной количественной интерпретации. Так, начальный изотопный состав двуокиси углерода, которая выделяется в катализируемой ионами магния реакции декарбоксилирования оксалоацетата, соответствует изотопному эффекту $^{12}\text{C}/^{13}\text{C} = 1,06$, но в реакции декарбоксилирования этого соединения, катализируемого ферментом, заметного изотопного эффекта не наблюдается. Это ясно указывает на то, что скорость определяющая стадия неферментативной реакции, как и следовало ожидать, включает декарбоксилирование [схема (2), стадия 1], а в ферментативной реакции в процессе скорости определяющей стадии расщепления связи углерод — углерод не происходит, так что лимитирующей должна быть некоторая другая стадия, например кетонизация енольного продукта в пируват {схема (2), стадия 2}



* Для более детального ознакомления см. [1].

** В литературе часто используют термин «протий» для легкого изотопа водорода, а термин «водород» рассматривают как собирательный для всех трех изотопов этого элемента. Автор всюду под словом «водород» подразумевает «протий», и для удобства при переводе была сохранена эта терминология. — *Прим. ред.*

Несмотря на то что многие реакции обнаруживают «нормальные» кинетические изотопные эффекты дейтерия в пределах $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} \sim 6-10$ (как найдено в случае енолизации ацетона), любая полная теория должна объяснить кинетические и равновесные изотопные эффекты, которые охватывают значительно более широкий диапазон, начиная даже с изотопных эффектов менее единицы. С одной стороны, сюда относятся такие реакции, как удаление протона от 2-нитропропана под действием 2,6-лутидина [4] с $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 24$ и отщепление атома водорода от метанола или ацетата с образованием газообразного водорода [5], для которых $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 20...22$. С другой стороны, существует много реакций с малым или обратным (менее единицы) изотопным эффектом: обмен протона и рацемизация некоторых карбоновых кислот [6] с $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ в интервале 0,3... 1,9, катализируемый по общесосновному механизму аминолиз фенилацетата глицином [7] с $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 1,1$, кислотнo катализируемый гидролиз сахарозы [8] с $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 0,49$. Кроме того, многие реакции обнаруживают изменения в скорости при изотопном замещении атомов, отличающихся от тех, которые переносятся. Интерпретация таких вторичных изотопных эффектов была спорной, но в настоящее время они достаточно хорошо изучены, чтобы их можно было использовать при выяснении механизмов реакций.

С самого начала необходимо четко разграничить изотопные эффекты, наблюдаемые с атомами водорода, которые не обмениваются быстро со средой (такими, как в большинстве углерод-водородных и бор-водородных соединений), и эффекты, наблюдаемые с быстро обменивающимися атомами водорода, связанными с кислородом, азотом или серой. Если изотопное замещение проводят для первого класса соединений, реакцию каждого изотопного соединения можно изучать как в воде, так и в окиси дейтерия. Для второго класса соединений обмен протона с растворителем происходит быстро, так что природа атома, который переносится, зависит от состава растворителя. Интерпретация наблюдаемого различия в скорости реакций в воде, в окиси дейтерия и в смеси этих растворителей должна включать как учет изотопных эффектов равновесного распределения атомов водорода и дейтерия, так и различие во взаимодействиях с изотопно различными растворителями и, наконец, кинетический изотопный эффект переносимого атома.

Несмотря на то что детальная теоретическая интерпретация механизма первичного изотопного эффекта дейтерия — проблема большой сложности и до конца не ясна [9—11], многие важные аспекты этой проблемы можно рассматривать упрощенно с точностью, которая достаточна для большинства экспериментальных работ и которая обеспечивает по крайней мере качественное понимание механизма наблюдаемых эффектов. Наиболее важной причиной изотопных эффектов дейтерия является различие в нулевых энергиях связей с водородом и дейтерием, и сам факт существования изотопных эффектов является непосредственным следствием принципов квантовой механики. В соответствии с этими принципами энергетические уровни атома водорода, связанного, например, с атомом углерода, квантованы, и самое нижнее энергетическое состояние C — H-связи не является самой нижней точкой потенциальной энергетической кривой для этой системы, а лежит выше этого минимума на расстоянии, соответствующем нулевой энергии (рис. 1). Нулевая энергия равна $\frac{1}{2}h\nu$ (где h — постоянная Планка, ν — частота колебания C — H-связи). Используя закон Гука для описания деформации связи, можно показать, что ν пропорционально $1/\sqrt{\text{массы}}$. Частоты колебаний C — H- и C — D-связей равны соответственно 2900 см^{-1} и 2100 см^{-1} , что приводит к нулевым энергиям 4,15 и 3,0 ккал/моль ($17,38$ и $12,56 \cdot 10^3$ Дж/моль) соответственно. Именно различие в массах между водородом и дейтерием является важнейшим фактором, определяющим различия в частотах этих колебаний, так как атом, с которым связаны водород или дейтерий, много тяжелее и остается при колебаниях неподвижным.

Если атом водорода переносится на акцептор В, то в переходном состоянии валентное колебание исчезает и превращается в трансляционное колебание атома водорода по направлению к акцептору в самой высокой точке энергетического профиля (рис. 2). Поскольку $C-H$ и $C-D$ - соединения достигают того же энергетического максимума, но различаются нулевыми энергиями, разница между количествами энергии, необходимыми для образования переходного состояния, будет определяться разностью нулевых энергий $4,15 - 3,0 = 1,15$ ккал/моль ($2,09 \cdot 10^3$ Дж/моль). Это соответствует

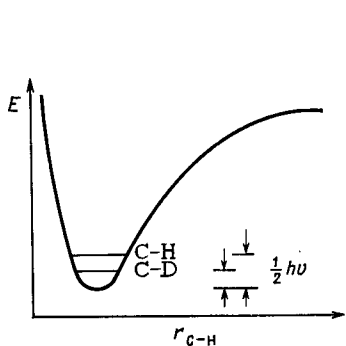


Рис. 1. Различие в нулевых энергиях связей углерод — водород и углерод — дейтерий.

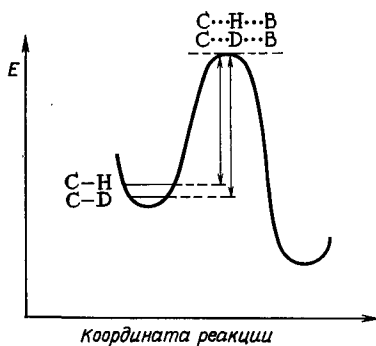


Рис. 2. Для реакции, в которой происходит потеря нулевой энергии в переходном состоянии, различие в скоростях реакции водород- и дейтерийсодержащих соединений будет соответствовать разности нулевых энергий связей этих атомов в основном состоянии.

семикратному различию в скоростях при комнатной температуре. Соответствующие различия в частотах колебаний и нулевых энергиях для связей $O-H$ и $O-D$ дают константу скорости для водорода приблизительно в 10 раз больше, чем для дейтерия.

В изложенном выше рассмотрении учитывалась только утрата валентного колебания, что является грубым приближением к реальной ситуации. В переходном состоянии могут быть изменения в деформационных колебаниях, а также могут появиться новые валентные колебания. Далее изолированное рассмотрение колебания единственной $C-H$ -связи в многоатомной молекуле является чрезвычайным упрощением. Это колебание в большей или меньшей степени связано с другими колебаниями, так что изменение частоты при замещении дейтерия на водород не всегда можно предсказать. Тем не менее ясно, что потеря нулевой энергии валентного колебания и соответствующее различие в количестве энергии, требуемой для достижения переходного состояния, определяют основную часть наблюдаемого различия в скоростях переноса водорода и дейтерия почти во всех реакциях, которые обнаруживают заметный кинетический изотопный эффект. Важнейшей предпосылкой для теоретической интерпретации изотопных эффектов является предположение об отсутствии различий в поверхностях потенциальной энергии для соединений или реакций, включающих водород и дейтерий; наблюдаемое различие в скоростях и константах равновесия возникает из-за неодинаковости минимальных энергетических уровней, которая в свою очередь является следствием различий в частотах колебаний водород- и дейтерийсодержащих молекул в основном и переходных состояниях.

Полезное качественное обобщение, которое приложимо как к первичным, так и к вторичным и равновесным изотопным эффектам, заключается в том,

что дейтерий будет иметь тенденцию концентрироваться (и дейтерийсодержащие частицы будут более стабильны) в тех молекулах и переходных состояниях, энергетические свойства которых описываются узкими потенциальными ямами [12]. Можно считать, что нулевая энергия является следствием принципа неопределенности и будет максимальной в тех случаях, когда положение данного атома наиболее определено, т. е. когда оно ограничено относительно узкой потенциальной ямой и атом колеблется с высокой частотой. Большая нулевая энергия такого атома означает, что при замещении Н на D будет наблюдаться также и большое уменьшение энергии.

Более высокие изотопные эффекты, наблюдаемые для трития, являются простым следствием большей массы этого изотопа и больших различий в частотах колебаний и нулевых энергиях. Если механизм этого изотопного эффекта тот же, что и в случае дейтерия (т. е. туннельный эффект не проявляется), то различие в потере нулевых энергий для водорода и трития должно быть непосредственно связано с массами этих атомов. Ожидаемое соотношение изотопных эффектов для дейтерия и трития дается уравнением

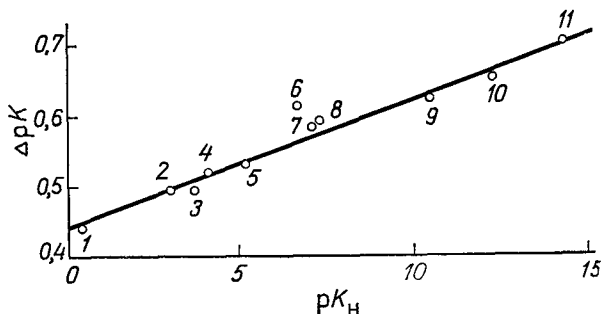
$$\log \frac{k_H}{k_T} = 1,44 \log \frac{k_H}{k_D}, \quad (3)$$

которое подтверждалось экспериментально в нескольких случаях [13].

Другое важное следствие квантовой механики, которое следует из принципа неопределенности, заключается в том, что атом водорода может быть перенесен сквозь узкий потенциальный барьер, а не над ним за счет *туннельного эффекта* [14]. Принцип неопределенности не разрешает точно указать положение малых частиц, таких, как электрон. Для частиц с массами большинства атомов эта неопределенность незначительна, но для относительно небольшого протона она может быть заметной, если потенциальный барьер для его переноса не слишком широк. Другими словами, неопределенность положения протона достаточно велика, так что существует некоторая вероятность, что протон, который вначале был на одной стороне узкого потенциального барьера, может быть в то же время найден на другой стороне без перехода его через вершину барьера. Туннельный эффект менее важен для дейтерия и трития вследствие их больших масс. Это различие вероятности туннельного эффекта будет давать определенный вклад в наблюдаемый изотопный эффект для водорода по сравнению с дейтерием или тритием. Большой изотопный эффект ($k_H/k_D = 24,1$) при удалении протона от 2-нитропропана основанием 2,6-лутидина был объяснен туннельным эффектом; можно сравнить этот эффект с $k_H/k_D = 9,8$ для соответствующей реакции с пиридином [4]. Энергетический барьер первой реакции определяется большей частью энергией деформации связей некоторых атомов, создающих стерические препятствия. Энергия деформации сильно зависит от расстояния, так что энергетический барьер, по-видимому, должен быть узким и крутым. Эти условия благоприятны для проявления туннельного эффекта. Более того, различие в кажущихся энергиях активации изотопных реакций 2,6-лутидина составляет 3 ккал/моль ($12,56 \cdot 10^3$ Дж/моль), отношение частотных факторов — 0,15. Это различие в энергиях активации для переноса водорода и дейтерия значительно больше, чем разница нулевых энергий, и лучше всего объясняется существованием туннельного эффекта; различие частотных факторов даже более убедительно, хотя и менее очевидно свидетельствует в пользу туннельного эффекта [14]. Интересно отметить, что туннельный эффект не всегда вызывает отклонения от уравнения (3), хотя и может быть причиной этих отклонений. Так, наблюдаемое значение $k_H/k_T = 79$ для ионизации 2-нитропропана под действием 2,4,6-триметилпиридина находится в хорошем соответствии со значением 83, рассчитанным при помощи уравнения (3) на основании дейтериевого изотопного эффекта, равного для этой реакции 23 [4].

Б. РАВНОВЕСИЯ В ВОДЕ И В ОКСИ ДЕЙТЕРИЯ

Реакции, которые подвергаются специфическому кислотному катализу (такие, как гидролиз сахарозы) при данной кислотности в окиси дейтерия протекают в 2 — 3 раза быстрее, чем в воде. Это может быть следствием того, что кислотность многих сильных кислот в окиси дейтерия уменьшается в 2 — 3 раза. Реакция, катализируемая по механизму специфического



Р и с. 3. Изотопный эффект в кислотности фенолов и спиртов как функция силы кислоты рКН [16].

Соединения: 1 — пикриновая кислота; 2 — 4-хлор-2,6-динитрофенол; 3 — 2,6-динитрофенол; 4 — 2,4-динитрофенол; 5 — 2,5-динитрофенол; 6 — 3,5-динитрофенол; 7 — m-нитрофенол; 8 — o-нитрофенол; 9 — гидрохинон; 10 — 2,2',2''-трифторэтанол; 11 — 2-хлорэтанол.

кислотного катализа, протекает в две следующие стадии: 1) быстрое, равновесное протонирование субстрата [схема (4)] и 2) реакция протонированного субстрата с образованием продуктов [схема (5)]:



Если переноса протона на второй стадии не происходит, то константа скорости k_2 будет приблизительно одинаковой в воде и в окиси дейтерия. Различие в скорости процесса объясняется тем, что равновесная концентрация сопряженной кислоты субстрата в окиси дейтерия в 2 — 3 раза выше, чем в воде при данной кислотности, поскольку SD^+ в D_2O , как правило, — более слабая кислота, чем SH^+ в H_2O .

Наиболее простое объяснение различия в силах кислот заключается в том, что диссоциация протона [равновесие (6)] включает потерю нулевой энергии связи $A - H$ аналогично потере нулевой энергии в переходном состоянии для переноса протона, так что большая потеря нулевой энергии



для дейтерокислоты делает диссоциацию $A - D$ более трудной, чем диссоциацию $A - H$. Можно ожидать, что в более сильных кислотах протон связан менее прочно и связь $A - H$ должна иметь меньшую частоту колебаний, чем в более слабых кислотах. Разница в нулевых энергиях и дейтериевый изотопный эффект должны, таким образом, быть меньше для более сильных кислот, что и подтверждено в некоторых случаях экспериментально (рис. 3) [15, 16].

Хотя в этом рассуждении есть несомненный элемент истины, ясно, что оно не является общим, поскольку кислоты, более сильные, чем сольватированный протон (такие, как сопряженная кислота сахарозы), проявляют дейтериевый изотопный эффект в том же направлении, что и более слабые

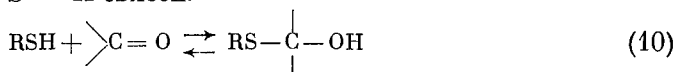
Таблица 1

Изотопный эффект дейтерия в процессе диссоциации слабых кислот [17]

Кислота	pK_a	K_{H_2O}/K_{D_2O} (наблюдаемое)	K_{H_2O}/K_{D_2O} (вычисленное)
Вода	15,74	6,5	4,6
β -Трифторэтанол	12,4	4,4	4,5
HCO_3^-	10,25	4,4	3,8
<i>n</i> -Нитрофенол	7,21	3,67	3,3
Уксусная кислота	4,74	3,33	3,1
Хлоруксусная кислота	2,76	2,76	2,8

и двух для воды (около 3400 см^{-1}). Изменения в характере взаимодействий и в соответствующих частотах молекул воды, связанных водородной связью, приводят к тому, что перенос дейтрона от D_3O^+ к основанию A^- вызывает обычно меньшее увеличение общей нулевой энергии, чем соответствующий перенос протона от H_3O^+ , независимо от того, является $H-A$ более сильной или более слабой кислотой, чем H_3O^+ .

Использование подхода Бантона и Шайнера при рассмотрении каждой реакции часто затруднено неполнотой сведений в настоящее время о детальной природе водородных связей между растворенным веществом и водой. Более того, для некоторых реакций невозможно пренебречь изменениями в деформационных колебаниях. Так, для того чтобы объяснить значение $K_{H_2O}/K_{D_2O}=0,44$ для реакции присоединения метоксиэтанттиола к ацетальдегиду {схема (10)} [18], необходимо учитывать изменения в деформационных частотах $O-H$ и $S-H$ -связей.



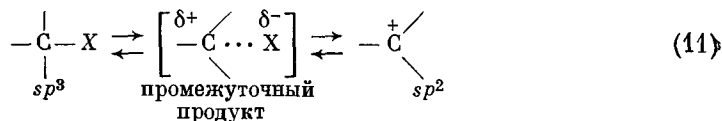
Тем не менее этот подход удовлетворительно объясняет изотопные эффекты в некоторых равновесиях и успешно применялся для объяснения кинетических изотопных эффектов [19].

В. ВТОРИЧНЫЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ [20]

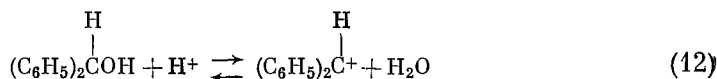
Вторичные изотопные эффекты вызываются изотопным замещением атомов, которые не являются «реагирующими». Для большинства реакций легко установить различие между первичными и вторичным изотопными эффектами, но иногда трудно решить, является ли атом «реагирующим» или «нереагирующим» в переходном состоянии. В конечном счете не существует четкого различия между первичными и вторичными изотопными эффектами, потому что оба они вызываются изменениями в частотах колебаний и нулевых энергий между основными и переходными состояниями, и любой атом, который вызывает такое изменение, будет в некотором смысле реагирующим. Вторичные изотопные эффекты часто разделяют на такие категории, как «индуктивные», «стерические» и «резонансные» эффекты. Эти термины полезны для описания наблюдаемых эффектов, но они не имеют того смысла, который имеют обычные индуктивные, стерические и резонансные эффекты, и важно помнить, что они в конечном итоге вызываются изменениями в частотах колебаний, а не изменениями в поверхностях потенциальной энергии [20, 21], хотя часто удобно говорить, что изменения в скоростях и равновесиях выглядят так, как если бы изотопное замещение приводило к возникновению индуктивного, стерического и резонансного эффектов.

1. ИЗМЕНЕНИЕ ЧАСТОТ КОЛЕБАНИЙ СВЯЗЕЙ С НЕРЕАГИРУЮЩИМИ АТОМАМИ

В реакциях карбониевых ионов реагирующий атом углерода претерпевает изменение гибридизации sp^3 в sp^2 , которое связано с изменениями в частотах колебаний связей с соседними атомами [схема (11)].



Если соседние атомы являются атомами водорода или дейтерия, эти изменения в частотах будут приводить к различию в нулевых энергиях основных и переходного состояний и к возникновению вторичного изотопного эффекта. Так, сольволиз циклопентилтозилата- α - d протекает на 15% медленнее, чем сольволиз водородного соединения [22]. Преобразование гибридизации sp^3 в sp^2 вызывает лишь небольшие изменения в валентном и одном деформационном колебаниях, но может приводить к более заметным изменениям в других деформационных колебаниях, например в интервале от 1340 до 800 см^{-1} в модельных соединениях с sp^2 -гибридизацией, таких, как альдегиды. Можно было бы ожидать, что такое изменение обусловит изотопный эффект, равный 1,38, поэтому наблюдаемый изотопный эффект, равный 1,15, можно объяснить приближением частоты этого деформационного колебания к частоте колебания иона карбония в переходном состоянии. Несколько больший изотопный эффект $K_{\text{H}}/K_{\text{D}} = 1,29$ при замещении дейтерия в α -положении был найден для равновесного образования иона карбония из бензгидрола {схема (12)} [23].



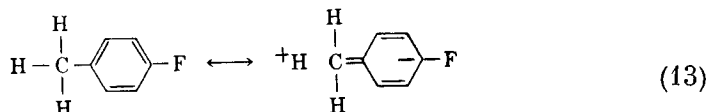
Кинетические эффекты такого рода наблюдали в некоторых химических реакциях, и они привлекли внимание как метод определения природы скорости определяющей стадии в реакциях катализируемых ферментами. Взаимосвязь вторичных и первичных изотопных эффектов будет описана в разд. Г,5.

2. ИНДУКЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ

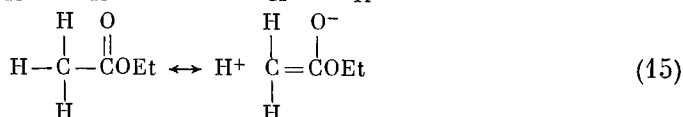
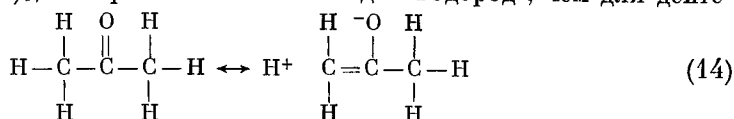
Замещение дейтерия на водород в нереакционном положении очень часто приводит к такому изменению химического поведения молекулы, как будто дейтерий был немного более электронодонорным атомом, чем водород [20]. Так, константа кислотной диссоциации фенола на 12% больше, чем фенола- d_5 , дейтеромуравьиная кислота DCOOH более слабая, чем муравьиная, с разницей в значении pK на 0,035 единицы [24]. Более строгий анализ участия изотопного эффекта в ионизации муравьиной кислоты показывает, что различие в pK является результатом суммирования влияния малых сдвигов некоторых частот колебаний муравьиной кислоты, дейтеромуравьиной кислоты и их анионов [25], но для большинства практических целей кажется удобным рассматривать различия такого рода как простой индукционный эффект заместителя. Небольшое различие в дипольных моментах водород- и дейтерийсодержащих соединений также можно рассматривать как результат большего электронодонорного эффекта дейтерия, что можно приписать более короткой эффективной длине связи $\text{C} - \text{D}$ по сравнению со связью $\text{C} - \text{H}$ [20].

3. ГИПЕРКОНЪЮГАЦИЯ

Наблюдение ядерного магнитного резонанса ядер ^{19}F в *n*-фтортолуоле дает прямой метод установления различий в электронном окружении атома фтора. Такие измерения с *n*-фтортолуолом и *n*-фтортолуолом- d_3 указывают на меньшую электронодонорную способность дейтерированной метильной группы по сравнению с нормальной. Это противоречит ожидаемому электронодонорному индуктивному эффекту дейтерия и наиболее рационально интерпретируется как свидетельство гиперконъюгации с *para*-положением, которая менее существенна для дейтерия, чем для водорода, поскольку гиперконъюгация подразумевает потерю нулевой энергии {схема (13)} [26].

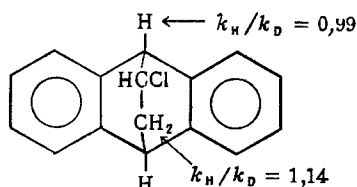
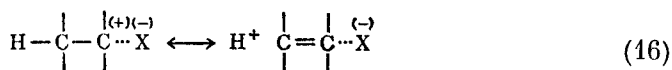


Наблюдаемое изменение меньше, чем можно было бы ожидать, но тот факт, что замещение водорода на дейтерий в *meta*-положении не вызывает никаких различий, подтверждает предположение, что в данном случае имеет место гиперконъюгация. Тот факт, что присоединение метанола к ацетону протекает на 30% медленнее, чем к ацетону- d_6 , и что ион гидроксила реагирует с этилацетатом на 10% медленнее, чем с дейтерированным, можно также объяснить стабилизацией исходных соединений посредством гиперконъюгации [схема (14) и (15)], которая более значима для водород-, чем для дейте-



рийзамещенных соединений; однако изотопный эффект в последней реакции осложнен необычной температурной зависимостью, так что ситуация слишком сложна, чтобы в настоящее время можно было бы сделать окончательные выводы [27—29].

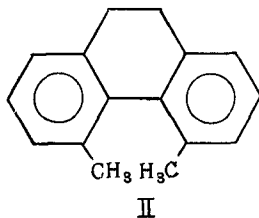
Наиболее строгое свидетельство важности гиперконъюгации следует из изучения β -дейтериевого изотопного эффекта в процессах сольволиза. Замещение водорода на дейтерий в β -положении вызывает уменьшение на 16% скорости сольволиза циклопентилтозилата, которого можно было бы ожидать, если гиперконъюгация с атомом в этом положении обеспечивала бы существенную стабилизацию образующейся в переходном состоянии структуры карбониевого иона {схема (16)} [22].



Аналогичное влияние ($k_H/k_D = 1,14$) на скорость сольволиза наблюдается при дейтериевом замещении в метиленовой группе бициклического соединения (I), однако никакого изменения скорости не наблюдается, если замещение происходит в положение, в котором невозможна гиперконъюгация, сопровождающаяся частичным образованием двойной связи [30].

4. СТЕРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Более низкая нулевая энергия дейтерия по сравнению с водородом означает, что средняя длина связи С — D несколько меньше, чем средняя длина связи С — H. Это приводит к небольшим изменениям эффективных размеров соединений или групп, в которых водород замещен на дейтерий, однако эти различия очень малы. Эффективная длина связи С — H приблизительно на 0,005 Å больше, чем длина связи С — D, и молекула бензола- d_6 приблизительно на 0,3% меньше, чем обычного бензола [31]. Молярная рефракция (мера поляризуемости) для бензола на 0,5% больше, чем для бензола- d_6 [32]. Ряд попыток, предпринятых с целью установления вклада стерических эффектов в различие скоростей реакций водород- и дейтерийзамещенных соединений, показал, что различия в скоростях незначительны; однако для некоторых реакций, которые связаны с определенными стерическими требованиями, была найдена существенная разница в константах скоростей реакции. Так, рацемизация 9,10-дигидро-4,5-диметилфенантрена (II) протекает через сильно стерически затрудненное переходное состояние, в котором метильные группы скользят одна по другой



Соединение, в котором водород метильных групп замещен на дейтерий, претерпевает рацемизацию на 13% быстрее, чем соответствующее водородсодержащее соединение [33].

5. ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЯ

Помимо изотопных эффектов растворителя, которые более или менее строго могут быть объяснены образованием водородных связей между растворенными веществами или переходными состояниями и растворителем, в воде и окиси дейтерия существуют различия в сольватации, которые не удается непосредственно отнести к образованию водородных связей и которые можно объединить вместе как «неспецифические эффекты растворителя». В настоящее время не легко сделать какие-либо обобщения о природе этих эффектов, за исключением того, что они малы, максимальное значение их в большинстве случаев достигает 30—40% и почти всегда реакции в окиси дейтерия протекают медленнее. Диэлектрические постоянные воды и окиси дейтерия почти одинаковы, однако в настоящее время общепринято, что окись дейтерия заметно более «структурирована», чем вода, на что указывает, например, ее повышенная вязкость (на 23%), так что можно ожидать, что взаимодействия растворенного вещества с растворителем, которые зависят от структуры растворителя, будут различаться в этих двух растворителях. Большинство ионов, которые являются «структуроразрушающими», несколько (примерно на 40%) более растворимо в воде, чем в окиси дейтерия, в то время как фторид

лития, который является «структурообразующей» солью, более растворим в окиси дейтерия. Различия в энтальпии и энтропии растворения различных солей много больше, чем различия в свободных энергиях, что можно было бы ожидать, если проявляются различия во влиянии солей на «структуру растворителя» [34—36]. Сравнение свободных энергий переноса ряда различных хлоридов из воды в окись дейтерия показывает, что различия в сольватации катионов очень малы, но анионы в этих двух растворителях сольватируются по-разному, что следует ожидать, поскольку анионы сильнее, чем катионы, взаимодействуют с протонами или дейтронами воды [37].

Труднее интерпретировать сольватацию в воде и окиси дейтерия неполярных веществ. Большая растворимость в окиси дейтерия (до 10%) некоторых углеводородов и аргона, которые, по-видимому, при растворении вызывают увеличение «структурирования» растворителя, находится в согласии с постулированной «структурой» окиси дейтерия [38, 39]. Однако растворимость простых галоидоалкилов в окиси дейтерия равна или на 10% меньше, чем в воде [40], растворимость иода также на 20% меньше в окиси дейтерия [41]; оценки растворимости гидрофобных углеводородных боковых остатков аминокислот после поправки на влияние растворителя на заряженные группы этих молекул показывают, что свободная энергия этих неполярных групп также выше в окиси дейтерия, чем в воде [38]. Очевидно, другие факторы, помимо «структуры растворителя», такие, как различия в поляризуемости, следует использовать для объяснения этих эффектов.

По-видимому, различия в свободных энергиях, которые являются результатом «эффекта растворителя», должны влиять на скорости реакций, но сделать какие-либо обобщения о величине и даже направлении этих эффектов трудно без достаточной информации об изотопном влиянии растворителя на стабильность соединений, которые являются подходящими моделями основного и переходного состояний данной реакции.

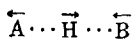
Г. ВЕЛИЧИНА КИНЕТИЧЕСКИХ ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ

Существует много реакций, которые включают перенос протона, но которые не обнаруживают «нормальных» дейтериевых изотопных эффектов в пределах $k_H/k_D = 6...10$. Ранее уже обсуждалась возможность чрезвычайно больших изотопных эффектов, в случае если в переносе протона важную роль играет туннельный эффект, а также рассматривались аномальные изотопные эффекты в равновесиях с переносом протона, имеющих место до скорости определяющей стадии реакции. Некоторые другие возможности, которые были предложены для объяснения «аномальных» изотопных эффектов, обсуждаются в данном разделе.

1. АСИММЕТРИЧНЫЕ ПЕРЕХОДНЫЕ СОСТОЯНИЯ

Иногда предполагают, что малая величина изотопного эффекта в реакции переноса протона связана либо с небольшим разрушением связи в реагирующем веществе, либо с сильным образованием связи с акцептором водорода, так что большая часть нулевой энергии валентного колебания связи с водородом в исходном веществе или в продуктах реакции сохраняется и в переходном состоянии. Для линейной трехцентровой реакции, в которой перенос протона происходит на скорость определяющей стадии, такого рода объяснение в его простейшей форме несовместимо с теорией переходного состояния, так как одно из основных положений этой теории заключается в том, что валентное колебание вдоль координаты реакции не существует как таковое в переходном состоянии, в котором атом водорода находится

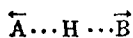
на вершине потенциального барьера, и претерпевает перемещение к акцептору водорода (III). Это вырожденное колебание не имеет потенциального



III

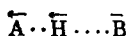
минимума и поэтому не может иметь нулевой энергии. Однако более детальное исследование показывает, что существуют причины, по которым в переходном состоянии может сохраняться заметная нулевая энергия, особенно в реакциях, в которых переходное состояние имеет высокую асимметрию [10, 11, 42—44].

Для линейного переходного состояния $A \cdots H \cdots B$ можно обсудить существование как асимметричных, так и симметричных валентных колебаний. Хотя для асимметричного валентного колебания III не существует нулевой энергии, симметричное колебание IV может существовать в переходном



IV

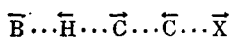
состоянии, поскольку оно не ведет ни к продуктам, ни к исходным веществам. Если переходное состояние симметрично и атом водорода не принимает участия в колебаниях, то в этом случае не будет различия между нулевыми энергиями для водорода и дейтерия в переходном состоянии и должен наблюдаться нормальный изотопный эффект. Однако если переходное состояние асимметрично (V) и имеет потенциальный минимум, благодаря которому



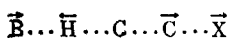
V

водород сохраняет колебательное движение, то нулевая энергия будет меняться при замещении водорода на дейтерий. Наблюдаемый изотопный эффект будет меньше по сравнению с теоретическим максимальным значением в той степени, в которой при этом колебании различие в нулевой энергии исходных соединений сохранится в переходном состоянии [10].

Однако и это рассмотрение в некоторых аспектах слишком упрощено. До сих пор неясно, каковы же силовые константы, которые описывают симметричное валентное колебание в переходном состоянии; кроме того, различные теоретические предположения расходятся в своих предсказаниях о степени, в которой уменьшается изотопный эффект в асимметричных переходных состояниях, хотя сходится в том, что это уменьшение существенно по крайней мере в большинстве асимметричных случаев [43—46]. Более того, многие, если не большинство, реакций протекают не через линейные трехцентровые переходные состояния. Реакция элиминирования, например, включает перемещение по крайней мере пяти атомов (VI и VII), и возможно, что валентное колебание, такое, как VII, которое не ведет к реакции, но которое в некоторой степени аналогично колебанию, соответствующему трансляции в переходном состоянии VI, может приводить к сохранению заметной

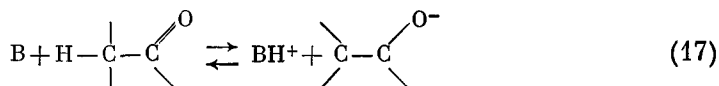


VI



VII

нулевой энергии. Аналогичная ситуация может иметь место в реакциях отщепления протона, таких, как енолизация кетона, в которой происходит существенная регибридизация, перераспределение заряда и движение атомов, которые должны вносить свой вклад в энергию и колебания в переходном состоянии [схема (17)]



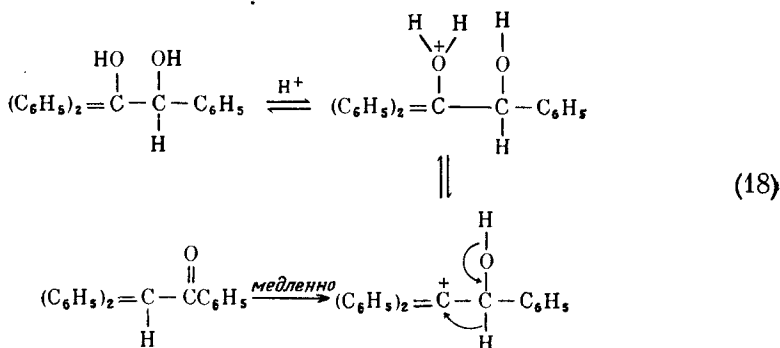
Помимо теоретического рассмотрения, существует несколько экспериментальных примеров, которые показывают, что изотопные эффекты больше для симметричных, чем для несимметричных переходных состояний. Так, изотопный эффект в реакции хлорирования H_2CD_2 , которая, по-видимому, имеет симметричное переходное состояние, равен 12,1, в то время как для реакции с участием толуола, которая, по-видимому, протекает через несимметричное переходное состояние, он равен всего лишь 1,4 [47]. Изучение констант скоростей процесса обмена протонов ароматических соединений, катализируемого по общекислотному механизму, и удаления протонов от карбокислот, катализируемого по общесновному механизму, обнаруживает максимум в изотопном эффекте в точке, в которой разница в pK между катализатором и субстратом близка к нулю [48]. Хотя эти корреляции дают количественное подтверждение той точки зрения, что изотопные эффекты уменьшаются с увеличением асимметрии переходного состояния, несколько удивительно, что переходное состояние, по-видимому, наиболее симметрично, когда ΔpK близко к нулю, поскольку существует различие в форме потенциальных энергетических кривых для $\text{C}-\text{H}$ - и $\text{O}-\text{H}$ -связей. Предполагается, что если энергия активации реакции становится небольшой, то изотопный эффект также становится небольшим, но, возможно, это вызывается не малой энергией активации, а связано с асимметрией переходного состояния во многих реакциях такого типа, которые обычно сильно экзотермичны [47, 49].

2. РОЛЬ ДЕФОРМАЦИОННЫХ КОЛЕБАНИЙ

Часто принимают, что нулевые энергии деформационных колебаний не вносят существенного вклада в величину изотопных эффектов, и действительно, детальные вычисления ожидаемых изотопных эффектов для некоторых относительно простых реакций показали, что можно пренебречь этим вкладом, не внося существенных искажений в общую величину ожидаемого эффекта. В частности, существует тенденция исключить из рассмотрения частоты деформационных колебаний в переходном состоянии в случае влияния туннельного эффекта на изотопный эффект [50]. Однако это, по-видимому, не верно для всех реакций, и, возможно, изменения в деформационных частотах ответственны за некоторые необычно большие или необычно малые изотопные эффекты [44, 51, 52]. Полная потеря нулевых энергий в переходном состоянии как валентных, так и деформационных частот связи с водородом приводит, согласно вычислениям, к дейтериевому изотопному эффекту, равному 17...48 [11, 47]. Деформационные частоты часто использовали для объяснения малых изотопных эффектов [51, 52]. Как будет показано ниже, они могут иметь большое значение в нелинейных переходных состояниях, но также могут иметь значение и для линейных переходных состояний, если в них возникает существенно новое деформационное колебание с соответствующей нулевой энергией. В качестве модели такого колебания в переходном состоянии можно рассматривать деформационное колебание бифторид-иона $\text{F}-\text{H}-\text{F}$ при 1200 см^{-1} , которое наблюдается при более высоких частотах, чем симметричное валентное колебание при 600 см^{-1} .

3. НЕЛИНЕЙНЫЕ ПЕРЕХОДНЫЕ СОСТОЯНИЯ

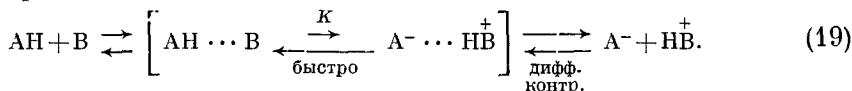
Изменения в частотах колебаний и нулевых энергиях, которые наблюдаются при образовании нелинейного переходного состояния, как в случае внутримолекулярной или циклической реакции, очевидно, отличны от тех изменений, которые сопровождают образование линейных переходных состояний и определяются в основном потерей валентного колебания. Если в переходном состоянии происходит потеря только деформационной частоты, изотопный эффект будет относительно небольшим, поскольку деформационным колебаниям соответствуют меньшие частоты и нулевые энергии по сравнению с валентными колебаниями. Величина изотопных эффектов для таких реакций, по-видимому, лежит в интервале $k_H/k_D = 2...3$ [53—55]. Так, скорость определяющей стадией пинаколиновой перегруппировки трифенилэтиленгликоля является внутримолекулярное перемещение гидридного иона к соседнему атому углерода [схема (18)]. Изотопный эффект для этой реакции для различных катализаторов лежит в интервале 2,3...3,3 [55]



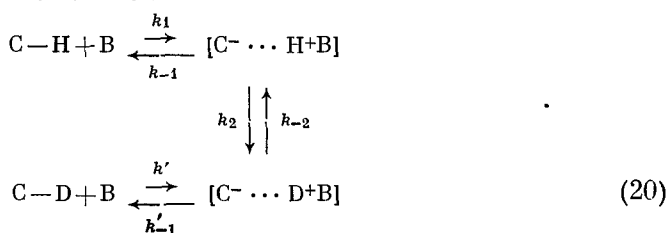
4. В ПЕРЕХОДНОМ СОСТОЯНИИ ПРОТОН НЕ НАХОДИТСЯ НА ВЕРШИНЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МАКСИМУМА

Вероятно, наиболее общей причиной существования малых или обратных изотопных эффектов является сохранение нулевой энергии из-за связывания протона либо с продуктом, либо с исходным веществом реакции, вследствие чего протон не претерпевает трансляцию в точке седловины энергетической поверхности, соответствующей переходному состоянию; иными словами, переходное состояние реакции не является переходным состоянием переноса протона. Наиболее очевидный пример такой ситуации — диффузионно контролируемая реакция, в которой скорость определяющей стадией является диффузия или вращательное перемещение молекул реагирующих веществ или продуктов, а не сам перенос протона. В этом случае наблюдаемый изотопный эффект будет связан только с процессом диффузии или вращения, а также с любым равновесием, предшествующим скорости определяющей диффузионной стадии. Такую ситуацию нетрудно установить, если скорость реакции равна максимальной скорости диффузионно контролируемого процесса (около 10^{10} л·моль⁻¹·с⁻¹). Более трудным случаем являются медленные реакции, в которых скорость определяющей диффузионно контролируемой стадии предшествует одна или несколько неблагоприятных равновесных стадий. Как указывалось в гл. 3, разд. Е, 4, в соответствии с принципом микроскопической обратимости реакцию, которая включает скорость определяющее столкновение двух реагирующих веществ в направлении, благоприятном для равновесия, можно рассматривать как включающую скорость определяющее разделение тех же реагирующих веществ в обратном направлении. Наблюдаемая скорость реакции в неблагоприятном направлении будет меньше, чем скорость диффузионно контро-

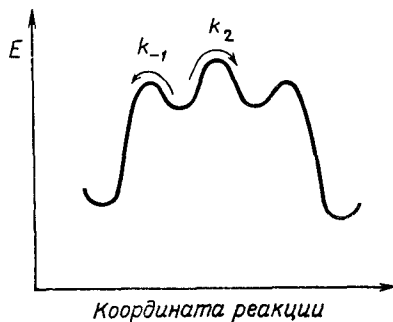
лируемой реакции, поскольку скорость определяющей стадии в этом направлении предшествует неблагоприятная равновесная стадия, т. е. реакционно-способный промежуточный продукт возвращается в исходные соединения чаще, чем он диффузионно разделяется с образованием продуктов реакции [схема (19), рис. 11, гл. 3]



В этом случае наблюдаемый изотопный эффект складывается из изотопного эффекта на равновесие, предшествующее скорости определяющей стадии, и изотопного эффекта процесса разделения продуктов, но не включает потерю нулевой энергии, вызываемую разрушением связи $\text{X} - \text{H}$ в переходном состоянии. Примером такой ситуации, по-видимому, может служить изотопный эффект $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 6,7$ для переноса протона от иона триметиламмония на молекулу воды в разбавленной кислоте [56] *. Изотопный эффект равновесия $K_{(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+}/K_{(\text{CH}_3)_3\text{ND}^+}$ равен 5,0; аналогичное значение следует ожидать для равновесного переноса протона, связанного водородной связью, так что наблюдаемый общий изотопный эффект можно приписать изотопному эффекту этого равновесия плюс небольшой изотопный эффект разделения продуктов. Скорость обмена водорода и рацемизация карбокислоты 2-октилфенилсульфона при сравнении с 2-октил-3-*d*-фенилсульфоном в различных растворителях характеризуются изотопным эффектом, который колеблется в пределах 0,3...1,9. Объяснение этих результатов, предложенное Крамом с сотрудниками [6], содержит описание существенно той же ситуации, хотя выражено в несколько других терминах. Механизм реакции обмена представлен схемой



Важным предположением Крама является то, что $k_{-1} > k_2$. Другими словами, промежуточный карбанионный продукт быстрее реагирует с протоном, который только что оставил его, чем этот протон успевает диффундировать в раствор и заместиться на дейтрон. В терминах диаграммы потенциальной энергии (рис. 4) это значит, что энергетический барьер для диффузии и обмена протона k_2 больше, чем барьер обратной реакции k_{-1} , так что скорость определяющей стадией является эта обменная диффузионная стадия **. Изотопный эффект этой реакции в большой степени определяется изотопным эффек-



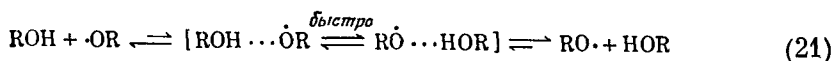
Р и с. 4. Если $k_{-1} > k_2$, скорость определяющей является стадия с константой скорости k_2 .

* Эта реакция протекает через образование промежуточной молекулы воды, и в сильно кислых растворах обмен с растворителем ингибируется обратной реакцией связанных водородной связью молекул воды с протонами растворителя; описание, приводимое здесь, относится лишь к первой стадии переноса протона на молекулу воды.

** Эту стадию можно лишь условно считать диффузионной, поскольку ее скорость определяется высоким энергетическим барьером недиффузионного происхождения.

том равновесия первой стадии. Аналогичную схему можно представить себе для реакции рацемизации, в которой скорость возвращения протона на карбонанион больше, чем скорость рацемизации, так что разрушение связи углерод-водород не является скоростью определяющей стадией.

В некотором смысле аналогичная ситуация существует в реакциях переноса атома водорода между экранированными фенолами, такими, как *трет*-бутилфенол и тетра-*трет*-бутилиндофенол, и соответствующими оксирадикалами. Эти реакции обмена протекают с относительно малой скоростью (примерно 10^2 л·моль⁻¹·с⁻¹ при 27 °C в четыреххлористом углеводе) и обнаруживают изотопный эффект всего лишь около 2,0 [57]. Из данных ядерного магнитного резонанса следует, что в этих реакциях образуется промежуточный комплекс. Скорость разрушения этого комплекса лежит в интервале $10^8 \dots 10^9$ с⁻¹. Это показывает, что скорость определяющей стадией разрушения комплекса является частично или полностью диффузионно контролируемое разделение продуктов. Реакцию можно представить схемой (21) (альтернативно, комплекс может быть симметричным)



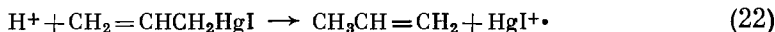
Малая скорость протекания всей реакции определяется стерическими помехами *трет*-бутильных групп, так что лишь небольшая доля столкновений точно ориентированных реагентов приводит к образованию комплекса. Эта точка зрения подтверждается тем фактом, что энергия активации образования комплекса составляет всего 1,2...2,1 ккал/моль ($5,02 \dots 8,79 \cdot 10^3$ Дж/моль), что характерно для диффузионно контролируемой реакции и относительно низкая скорость реакции является результатом неблагоприятной энтропии активации (от -38 до -43 энтр. ед.). Если эта интерпретация верна, то в данном случае имеем другой пример реакции, обладающей характерными чертами диффузионно контролируемого процесса, в котором образование или разрушение ковалентных связей происходит не на скорости определяющей стадии и которая протекает со скоростью, много меньшей, чем предельная скорость диффузионно контролируемой реакции.

В эту категорию также можно включить большую группу реакций, в которых происходит перенос протона между кислородом, азотом или серой, а также общий кислотный или основной катализ, сопровождающийся образованием или разрушением связей более тяжелых атомов. Большинство реакций карбонильной или ацильной группы является реакциями такого рода. Несмотря на то что детальная природа катализа переноса протона в этих реакциях до конца не понята, весьма вероятно, что в переходном состоянии этих реакций протон не находится на вершине потенциального барьера, хотя в переходном состоянии почти определенно его положение отличается от положения в исходных веществах или продуктах реакции. Эти реакции обычно протекают в окиси дейтерия в 2—3 раза медленнее, чем в воде [58] ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 3,0$ для общесосновного катализа имидазолом гидролиза этилхлорацетата [59]), но иногда они обнаруживают большие изотопные эффекты ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 4,0$ и 4,4 для общекислотного и общесосновного катализа реакции морфолина с δ -тиовалеролактоном [60]), или практически отсутствие изотопного эффекта ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 1,1$ для катализируемого по общесосновному механизму аминолиза фенилацетата глицином [7]), или даже обратный изотопный эффект ($k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}} = 0,59$ для общекислотного катализа присоединения метоксиэтантiola к ацетальдегиду [18]). Как указывалось в гл. 3, разд. Е,2, весьма вероятно, что в переходных состояниях реакций этого типа протон находится в более или менее стабильной потенциальной яме и может содержать существенную нулевую энергию.

5. ВТОРИЧНЫЕ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ

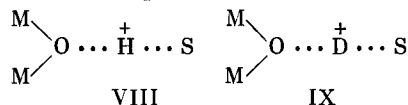
Нормальный первичный изотопный эффект может быть частично или полностью замаскирован обратным вторичным изотопным эффектом, который вызывается изменениями в частотах и нулевых энергиях при образовании водородных связей растворенного вещества с молекулами растворителя, не участвующими непосредственно в реакции переноса протона [19]. Важность таких вторичных изотопных эффектов, особенно для реакций с участием сольватированного протона, была понята только недавно. Несмотря на то что существуют определенные трудности в интерпретации этих эффектов, по крайней мере качественные аспекты можно истолковать, если понять основной принцип, который поэтому важно разобрать и проанализировать.

Наиболее важное качественное и количественное свидетельство в пользу существования такого рода изотопных эффектов получается из сравнения наблюдаемого изотопного эффекта для общей константы скорости с количеством дейтерия, включенного в продукт реакции из смешанного растворителя [61—63]. Так, если катализируемое кислотой разложение аллилмеркуриодида [схема (22)] изучается в смеси окиси дейтерия и воды, изотопный



эффект $\kappa_{\text{H}}/\kappa_{\text{D}} = (\text{RH}/\text{RD})_{\text{prod}} \times (\text{D}/\text{H})_{\text{solv}}$ может быть вычислен из относительного содержания водорода и дейтерия, включенного в продукт реакции с поправкой на состав смешанного растворителя. Для этой реакции изотопный эффект был найден равным 7,3 при любых составах растворителя [62]. Однако если измерить скорости реакции при сравнимых кислотностях в чистой воде и в окиси дейтерия, то окажется, что скорость реакции в воде всего лишь в 3,1 раза быстрее, чем в окиси дейтерия. Можно думать, что относительное количество водорода и дейтерия, включенных в продукт реакции, близко к истинному значению первичного изотопного эффекта, так как в этом случае состав растворителя одинаков как для водорода, так и для дейтерия. Прямые измерения скорости учитывают как первичный изотопный эффект, так и влияние различий между водой и окисью дейтерия как растворителей, т. е. различий в частотах и нулевых энергиях атомов, отличных от тех, которые переносятся в переходное состояние.

Рассмотренную реакцию можно проанализировать более детально. Предположим, что протонодонорной частицей является H_3O^+ (или ее изотопно замещенный эквивалент). Изотопный эффект, который определяется из состава продукта $\kappa_{\text{H}}/\kappa_{\text{D}}$, является мерой различий между изотопным составом растворителя и средним изотопным составом реагирующих атомов в переходном состоянии (VIII или IX, в котором M представляет собой H или D в зависимости от состава растворителя)



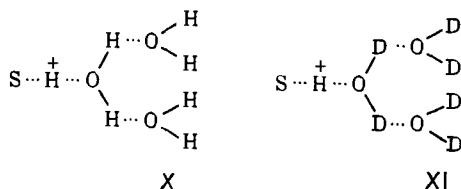
Эту величину можно разделить на две части: зависящую от изотопного распределения между растворителем и непосредственным донором протона — сопряженной кислотой субстрата (например, H_3O^+) и зависящую от распределения между этой кислотой и переходным состоянием. Последний член представляет собой первичный изотопный эффект, поскольку состав атомов M одинаков для VIII и для IX. Фактор распределения для сопряженной кислоты воды, выражаемый уравнением (23), был определен и оказался очень близок к $l = 0,69$:

$$l = \frac{(1/8\text{H}_3\text{O}^+)(1/2\text{D}_2\text{O})}{(1/3\text{D}_3\text{O}^+)(1/2\text{H}_2\text{O})} \quad (23)$$

(При этих определениях [64] принимали, что сольватированный протон существует в виде частицы H_3O^+ ; так как хотя и имеются свидетельства

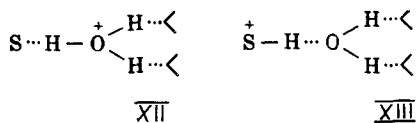
в пользу существования частиц H_3O^+ , однако протоны внешних молекул воды в этой частице изотопно эквивалентны протонам воды.) Таким образом, для этой реакции действительный изотопный эффект $(k_{\text{H}}/k_{\text{D}})_{\text{I}}$ равен $7,3 \times 0,69 = 5,1$. Это число отражает только различие между изотопным составом реагирующей кислоты (в данном случае H_3O^+ или его эквивалентом) и переходным состоянием. Если в переходном состоянии между H_3O^+ и субстратом вклинивается молекула воды, то следует полагать, что изотопный состав донора протона имеет сходство с водой, а не с H_3O^+ , и в этом случае поправка на фактор распределения l не нужна.

Наблюдаемое отношение констант скоростей в чистой воде и окиси дейтерия $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ равно $(k_{\text{H}}/k_{\text{D}})_{\text{I}} \cdot (k_{\text{H}}/k_{\text{D}})_{\text{II}}$, где $(k_{\text{H}}/k_{\text{D}})_{\text{II}}$ — вторичный изотопный эффект. Вторичный изотопный эффект отражает изотопные различия в частотах и нулевых энергиях связей с атомами, которые не переносятся в переходном состоянии, например различия между переходными состояниями X и XI. Вторичный изотопный эффект можно оценить посредством того же метода, как и для равновесных изотопных эффектов. Если принять, что X является верной моделью переходного состояния, то экспериментальное значение $(k_{\text{H}}/k_{\text{D}})_{\text{II}} = 3,1/5,1 = 0,61$ близко к значению,



найденному методом Бантона и Шайнера, и к значениям, наблюдаемым для некоторых других реакций, которые включают передачу в переходном состоянии протона от сольватирующей его частицы.

Вторичный изотопный эффект позволяет установить, в какой степени протонодонорная молекула похожа на воду или H_3O^+ в переходном состоянии, т. е. найти «долю» переноса протона — величину α по Брэнстеду [61—63]. Если непереносимые протоны кислоты в переходном состоянии похожи на протоны исходного соединения (XII), то в переходном состоянии перенос протона будет невелик, α будет мало и отсутствие различий в структуре между исходными веществами и переходным состоянием приведет к отсутствию вторичного изотопного эффекта. Если эти протоны похожи на протоны в воде (XIII), будет наблюдаться большая доля переноса протона в переходном состоянии, α будет велико и различие в частотах этих связанных водородной связью протонов в исходных веществах и переходном состоянии даст большой вторичный изотопный эффект, который будет аналогичен эффекту равновесного переноса от H_3O^+ на основание



Эта взаимосвязь количественно выражается уравнением (24), в котором l представляет собой фактор распределения, определяемый по уравнению (23):

$$\alpha = \frac{\log (k_{\text{H}}/k_{\text{D}})_{\text{II}}}{2 \log l}. \quad (24)$$

Для разложения аллилмеркурийиодида значение α , вычисленное по уравнению (24), равно 0,65.

Другое значение α можно получить из непосредственно наблюдаемых скоростей реакции в смешанном растворителе вода — окись дейтерия в соот-

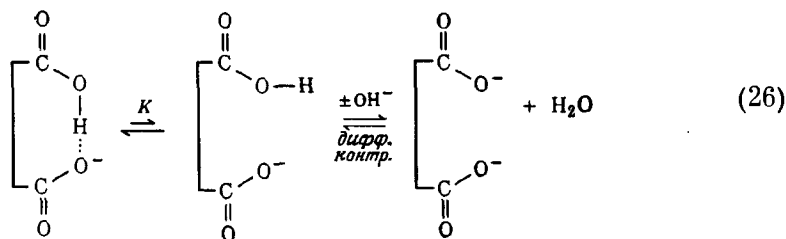
ветствии с уравнением (25), в котором n представляет собой долю атомов дейтерия в смешанном растворителе [61]:

$$\frac{k_n}{k'_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{(1 - n + nl^{1-\alpha})^2 (1 - n + nl^{1+2\alpha} k_{\text{D}_2\text{O}}/k_{\text{H}_2\text{O}})}{(1 - n + nl)^3} \quad (25)$$

Поскольку l — распределение изотопов между растворителем и сольватированным протоном для таких смешанных растворителей известно, можно определить, насколько переходное состояние похоже на сольватированный протон, просто определяя степень, в которой изотопное распределение для переходного состояния близко к изотопному распределению для сольватированного протона. Если в переходном состоянии почти не происходит переноса протона, оно изотопно близко к сольватированному протону ($\alpha = 0$) и фактор распределения равен l . Если в переходном состоянии происходит полный перенос протона, то донор протона в переходном состоянии похож на молекулу воды ($\alpha = 1,0$) и фактор распределения для протонов, которые не переносятся, равен 1,0. Было показано, что для разложения виниловых эфиров и цианокетендиметилацетата, катализируемых кислотой, значения α , определенные при использовании констант скоростей, найденных в смесях вода — окись дейтерия, и уравнения (25), находятся в хорошем согласии со значениями, установленными непосредственно из констант скоростей для катализа кислотами различной силы [65].

Величины вторичных изотопных эффектов можно найти путем сравнения состава продукта с результатами кинетических измерений только в том случае, если протон переносится на центр, который не претерпевает быстрого обмена с растворителем. Естественно ожидать, что аналогичные вторичные изотопные эффекты возможны и в реакциях переноса протона от сольватирующей его частицы на кислород, азот и серу. Существование таких вторичных эффектов будет приводить к уменьшению величины изотопных эффектов в наблюдаемых константах скорости. Так, для гидролиза *o*-эфира наблюдается обратный изотопный эффект $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 0,7$, несмотря на то что эта реакция подвергается общекислотному катализу [66]. По-видимому, и другие факторы могут быть причиной малых изотопных эффектов в этих реакциях, но то, что изотопный эффект для катализа сольватированным протоном часто находят много меньшим, чем изотопные эффекты для катализа другими кислотами в общекислотно катализируемых реакциях, несомненно указывает на значительную величину вторичного изотопного эффекта.

Малую величину изотопного эффекта в пределах 1,1 . . . 1,7 в реакции переноса протона от моноанионов дикарбоновых кислот, имеющих внутримолекулярную водородную связь, таких, как ион диалкилантарной или циклопропандикарбоновой кислоты, на ион гидроксидов приписывают маскирующему влиянию вторичного изотопного эффекта на первичный изотопный эффект, который может быть равен по крайней мере 6 [67]. Для другого объяснения малой величины изотопного эффекта в этой реакции исходят из того, что перенос протона контролируется диффузией и относительно малая скорость переноса протона вызвана тем, что лишь небольшая доля кислоты находится в реакционноспособной форме с разрушенной внутримолекулярной водородной связью [схема (26)]



Скорости реакций, в которых OD^- реагирует как нуклеофил, обычно на 20—40% выше, чем скорости соответствующих реакций с OH^- ; экстремальным случаем является катализируемое основанием отщепление триметиламина от β -фенилэтилтриметиламмонийного иона, в котором гидроксильный ион действует в качестве нуклеофила, отрывающего водород; в этой реакции $k_{\text{OD}}/k_{\text{OH}} = 1,79$ [68]. Этот изотопный эффект в большей части можно объяснить изменениями в частотах колебаний $\text{O} - \text{H}$ -связей молекул воды, которые образуют водородные связи с ионом гидроксила [19].

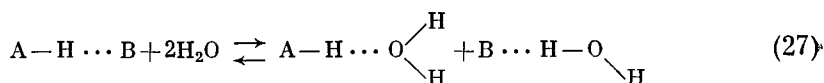
Д. ОБЩИЕ ВЫВОДЫ О ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТАХ ВОДОРОДА В ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ

Из изложенного выше ясно, что интерпретация изотопных эффектов достаточно сложна и нельзя сделать общего вывода, что отсутствие или наличие процесса переноса протона в переходном состоянии строго коррелирует с отсутствием или наличием «нормального» изотопного эффекта. Однако если можно показать, что общий изотопный эффект не связан с влиянием изотопного эффекта равновесной стадии, предшествующей скорости определяющей стадии, то существование «нормального» изотопного эффекта является свидетельством лимитирующего процесса переноса водорода в переходном состоянии. Наличие меньших изотопных эффектов означает, что существуют различия в нулевых энергиях и в положении водорода в исходных соединениях и переходном состоянии. В некоторых случаях были установлены разумные корреляции между величиной изотопных эффектов и наблюдаемыми или ожидаемыми изменениями в частотах колебаний связей и в нулевых энергиях реагирующих веществ, продуктов и переходного состояния. *Отсутствие* изотопного эффекта не исключает переноса водорода как существенной части механизма реакции и даже не доказывает, что водород не переносится в переходном состоянии. Реакции, которые подвергаются специфическому кислотному катализу, обнаруживают обратный дейтериевый изотопный эффект растворителя, однако обратные изотопные эффекты могут наблюдаться и в реакциях, катализируемых по общекислотному типу. По величине первичных изотопных эффектов невозможно надежно установить степень переноса протона в переходном состоянии, однако существуют свидетельства в пользу того, что такого рода оценки можно сделать при изучении вторичных изотопных эффектов в реакциях, катализируемых по общекислотному типу, которые включают сольватированный протон в качестве реагирующей частицы.

Данных, утверждающих, что изотопные эффекты могут быть полезны для разграничения механизмов, которые включают перенос протона, атома водорода или гидрид-иона, пока нет. Как иллюстрируют приведенные выше примеры, интервал наблюдаемых величин изотопных эффектов для переноса протона и атома водорода достаточно широк, и величины изотопных эффектов не обнаруживают устойчивого различия между этими двумя типами реакций. Реакции, включающие перенос гидрид-иона изучены менее тщательно, однако в реакции переноса гидрид-иона от циклогептатриена на дил-анизилфенилметил-катион были обнаружены изотопные эффекты в области $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 5$ [69].

Из величины изотопных эффектов также невозможно сделать каких-либо выводов о водородных связях в водном растворе. Концентрация связанных водородной связью олигомеров имидазола в нафталиновом растворе на 8% меньше для имидазола- d_4 , что соответствует разности свободных энергий 80 кал/моль (334 Дж/моль), и может указывать на то, что водородные связи ослабляются при дейтериевом замещении [70]. С другой стороны, образование связанных водородными связями олигомеров фтористого водорода в газовой фазе оказывается на 50 кал/моль (209 Дж/моль) более выгод-

ным при замещении водорода на дейтерий [71]. Как было показано, константа равновесия образования связанных водородными связями комплексов фенола в четыреххлористом углероде может как увеличиваться, так и уменьшаться при замещении водорода на дейтерий в зависимости от природы акцептора протона [72]. Ни один из этих результатов по существу не имеет прямого отношения к проявлению дейтериевого изотопного эффекта при образовании водородных связей в водном растворе, поскольку в этом случае возникновение или разрушение этих связей не включает «чистого» образования или разрушения связи, а есть результат процессов обмена и перераспределения водородных связей между реагирующими молекулами и растворителем [уравнение (27)].



Поскольку в этой системе нет изменения общего числа водородных связей, различие в стабильности водородных связей в воде и в окиси дейтерия является результатом небольших и непредсказуемых изотопных влияний на силы водородных связей в обеих частях уравнения (27).

Е. ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

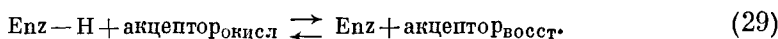
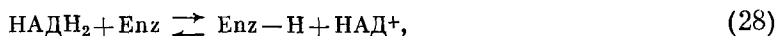
Изолированное наблюдение различия скорости ферментативно катализируемой реакции в воде и в окиси дейтерия не дает ничего существенного для понимания механизма реакции. Элементарные требования, необходимые для интерпретации изотопных эффектов в ферментативных реакциях, заключаются в следующем: 1) необходимо разделение влияний изотопного замещения на максимальную скорость и на K_M с дальнейшим разделением влияний на элементарные константы скоростей и равновесий реакции; 2) необходимо разграничение изотопных эффектов для водородных атомов, необменивающихся и быстро обменивающихся с растворителем; 3) для экспериментов, проводимых в растворах окиси дейтерия, необходимо определение влияния этого растворителя на зависимость максимальной скорости и константы Михаэлиса от кислотности. Изотопные эффекты в реакциях переноса необменивающихся атомов водорода, которые обычно связаны с углеродом, интерпретировать относительно легко, поскольку их можно изучать в растворителе постоянного состава, в то время как протоны, связанные с кислородом, азотом или серой, всегда обмениваются с растворителем с диффузионно-контролируемой скоростью, которая много выше, чем у изучаемой реакции; дейтериевый изотопный эффект в таких реакциях необходимо изучать при использовании окиси дейтерия в качестве растворителя, что влечет за собой определенные трудности в интерпретации результатов, связанных с влиянием растворителя.

1. ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ НА МАКСИМАЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

Максимальная скорость большинства ферментативных реакций включает константу скорости, отражающую изменения ковалентных связей, так что соответствующий изотопный эффект можно интерпретировать непосредственно в терминах механизма реакции. Отсутствие изотопного эффекта в реакции переноса водорода может быть вызвано одной из причин, обуславливающих малые изотопные эффекты, как это было описано выше для химических реакций, или может быть связано с тем, что скорость определяющей стадией реакции

является диссоциация конечного комплекса продукта и фермента, как, например, в случае некоторых дегидрогеназ. Существование «нормального» изотопного эффекта в реакции, включающей перенос необменивающегося с растворителем атома водорода, является достаточно надежным указанием на то, что максимальная скорость определяется стадией, на которой происходит перераспределение ковалентных связей.

Большинство изотопных эффектов, которые были изучены до настоящего времени в ферментативных реакциях, является «ненормальными» и трудно интерпретируемыми. Необычно «нормальный» и прямой результат был получен при изучении цитохром b_5 редуктазы — флавинового фермента, который катализирует восстановление цитохрома b_5 и других акцепторов электрона под действием НАДН₂ [73]. Реакция [схемы (28) и (29)] включает промежуточное восстановление фермента, при котором существует изотопный эффект:



Эта реакция была изучена более детально при использовании иона феррицианида в качестве акцептора электрона. Замещение дейтерием в положении 4 НАДН₂ не сказывается на константе Михаэлиса, но уменьшает максимальную скорость реакции в 3,7 раза для НАДН₂ и в 10,4 и 8,7 раза для ацетилпиридинового и пиридинальдегидного аналогов кофермента соответственно, если замещается атом водорода с той стороны кольца, которая примыкает к реакционному центру и участвует в реакции. Замещение другого атома водорода в положении 4 на дейтерий не дает заметного изотопного эффекта. Однако до настоящего времени еще не объяснены два факта, наблюдаемые для этого относительно «нормального» фермента: 1) непонятно различие в изотопных эффектах, которое обнаруживают разные аналоги кофермента; 2) непонятен тот факт, что дейтерий не обменивается с растворителем даже в течение больших периодов времени, хотя можно ожидать что он переносится на атом азота, связанного с ферментом флавина, и должен бы затем быстро обмениваться с растворителем.

Изотопные эффекты в ферментативных реакциях, которые проводят в окиси дейтерия, нельзя интерпретировать строго, хотя из данных достаточно детального исследования можно с различной степенью уверенности сделать определенные выводы. Прежде всего необходимо определить, насколько наблюдаемый изотопный эффект отражает изменения характеристик различных ионогенных форм фермента или субстрата при замене воды на окись дейтерия. Кислотность растворов в окиси дейтерия можно определить при помощи обычных стеклянных электродов, если к наблюдаемым показаниям рН-метра, который прокалиброван обычным стандартным буфером в водном растворе, прибавить поправку, равную 0,4 [74]. Желательна проверка этой процедуры непосредственным сравнением показаний рН-метра, полученных с 0,001M HCl в воде и с 0,001M DCl в окиси дейтерия. Различие в константах ионизации субстрата в воде и в окиси дейтерия можно определить непосредственно; соответствующее различие активных форм фермента можно обнаружить лишь из зависимости ферментативной активности от рН (или рD), либо путем изучения изотопного влияния на кислотность ионогенных групп, о которых известно, что они важны для проявления ферментативной активности. Сопоставление изотопных эффектов ионизации различного типа ионогенных групп было сделано Бантоном и Шайнером [17]. В окиси дейтерия большинство кислот в 3 — 5 раз слабее, чем в воде, что соответствует разнице в значении рK 0,5...0,7 единицы.

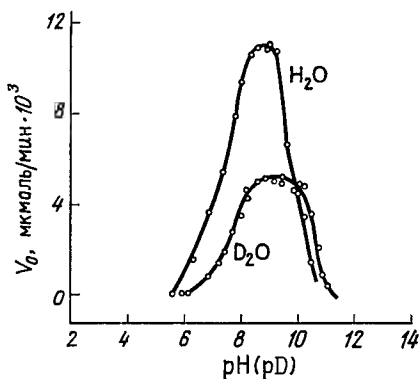
Наглядным примером зависимости изотопного эффекта от рН (рис. 5) является поведение цитратконденсирующего фермента в воде и окиси

дейтерия [75]. Различие в зависимости скорости реакции от кислотности в этих двух растворителях ведет в тому, что изотопный эффект меняется от максимального значения 3,5 до обратного изотопного эффекта, наблюдаемого в щелочных растворах. Очевидно, определение скорости при одном значении рН (pD) нельзя интерпретировать сколько-нибудь разумно. Наблюдаемая зависимость скорости реакции от кислотности в этих двух растворителях, по-видимому, отражает как изотопный эффект ионизации активных форм фермента, так и изотопный эффект скорости реакции активных ионогенных частиц фермента. Интересно отметить, что в этой реакции наблюдается большой изотопный эффект в константе Михаэлиса для ацетил-КоА, который с изменением кислотности меняется в пределах 6,3...0,8.

Наиболее серьезная трудность в интерпретации изотопных эффектов ферментативных реакций заключается в том, что при замене воды на окись дейтерия существует определенная вероятность изменения конформации фермента вследствие изменений свойств водородных связей, гидрофобных взаимодействий или других факторов. Сами по себе эти эффекты малы, но они могут быть усилены в ферментативной реакции, в которой существует тонкое равновесие между конформациями различной степени активности. Имеется непосредственное свидетельство того, что такое изменение растворителя может влиять на конформацию фермента: так, «температура плавления» рибонуклеазы в окиси дейтерия на 4 °С выше, чем в воде [76]. Кроме того, методом температурного скачка было показано, что скорость внутримолекулярной изомеризации рибонуклеазы, которая по-видимому, включает перенос протона, в окиси дейтерия в 4 — 6 раз меньше, чем в воде [77]. Двукратное *увеличение* скорости гидролиза *n*-нитрофенилпропионата, катализируемого карбоангидразой в окиси дейтерия, по-видимому, можно связать с таким конформационным изменением [78] *.

Некоторые возможные причины влияния изотопного замещения на стабильность различных конформаций фермента уже обсуждались; следует добавить, что при дейтериевом замещении существенно изменяются также и длины водородных связей. Так, кристаллографическое исследование дигидрата щавелевой кислоты показало, что при замещении водорода на дейтерий расстояние O — H — O увеличивается примерно на 0,04 Å [79]. Если структура субстрата строго соответствует структуре активного центра (расположению боковых цепей аминокислот, составляющих первичную последовательность), то, очевидно, при дейтериевом замещении это соответствие может существенно нарушаться за счет изменения длины нескольких водородных связей.

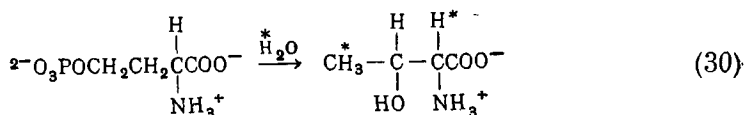
Необходимо помнить, что большой изотопный эффект трития может привести к сильному торможению переноса атомов трития в опытах по конкурентному введению изотопов, что в свою очередь может служить поводом для неправильных выводов относительно источника данного атома водорода. Если превращение О-фосфо- L-гомосерина в треонин, катализируемое треонин-



Р и с. 5. Зависимость от рН и рD максимальной скорости реакции, катализируемой цитратконденсирующим ферментом в воде и окиси дейтерия [75].

* Этот изотопный эффект, который наблюдается в области плато рН-профиля, нельзя связать с большей нуклеофильностью OD⁻ по сравнению с OH⁻, поскольку при данном значении рН (pD) концентрация OD⁻ будет в 6,5 раз меньше, чем концентрация OH⁻ ([78], табл. 1).

синтезазой, проводить в 100%-ной окиси дейтерия, то один атом дейтерия включается в γ -положение продукта реакции (другой атом включается в α -положение) [схема (30)].



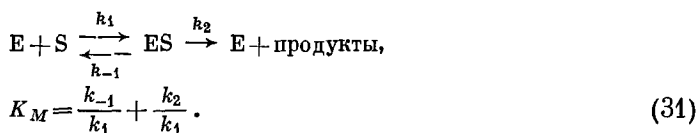
Однако если реакцию проводят в воде, содержащей следы трития, то включение трития в γ -положение составляет всего лишь 2% по отношению к количеству, которое следовало бы ожидать при отсутствии изотопного эффекта [80]. Наблюдаемый большой изотопный эффект (около 50) не является необычным для трития. Изотопный эффект трития в экспериментах по включению изотопов можно уменьшить, если опыты проводить с использованием окиси дейтерия в качестве растворителя, поскольку в этом случае уменьшается различие в массах атомов.

Эта реакция представляет собой один из примеров, в которых важно сделать четкое различие между экспериментами, проводимыми в чистой окиси дейтерия или с субстратом, полностью помеченным дейтерием, и экспериментами, проводимыми со смесями изотопно-меченных реагентов или растворителей. В первом случае все реакции протекают только с изотопно-меченным соединением и непосредственно из результатов измерений скоростей с мечеными и немечеными субстратами можно сделать определенные выводы. В последнем случае равновесная или стационарная концентрация изотопно меченного промежуточного соединения может меняться сложным образом в зависимости от кинетики реакции и необходим детальный кинетический анализ для правильной интерпретации величины изотопного эффекта. Измерения скоростей и распределения продуктов в ферментативных реакциях, изученных в смесях вода — окись дейтерия, часто приводят к различающимся результатам, по-видимому, вследствие вторичных изотопных эффектов, как было отмечено в разд. Г, 5 для неферментативных реакций.

2. ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ НА КОНСТАНТУ МИХАЭЛИСА

Если бы константа Михаэлиса была простой константой связывания и если бы изотопные эффекты вызывались полной потерей нулевой энергии валентного колебания в переходном состоянии, можно было бы ожидать, что изотопные эффекты не будут проявляться в константе Михаэлиса ферментативной реакции. Поскольку ни одно из этих предположений не является полностью справедливым, не удивительно, что существование изотопного влияния на константу Михаэлиса является скорее правилом, чем исключением. Интересно отметить, что существует большое и необъясненное различие (до 30%) в адсорбции различных изотопов водорода на активированном угле [81]. Ниже рассмотрены возможные причины изотопных эффектов константы Михаэлиса.

а) *Наличие заметного кинетического члена в константе Михаэлиса.* Даже для простейшей ферментативной реакции, представленной схемой (31), константа Михаэлиса, помимо константы диссоциации k_{-1}/k_1 , включает также и константу скорости k_2 ; константы Михаэлиса для более сложных механизмов реакции в общем случае будут также содержать кинетические константы:



Если эти кинетические константы достаточно велики и ими нельзя пренебречь в выражении для константы Михаэлиса, то изотопный эффект, например, константы скорости k_2 проявится и в константе Михаэлиса. Такие изотопные эффекты в константах Михаэлиса для соединений, меченных дейтерием в положениях, не способных к обмену с растворителем, могут быть полезны для интерпретации химического смысла этих констант.

б) *Эксперименты с использованием окиси дейтерия в качестве растворителя.* Трудности в интерпретации таких экспериментов обсуждались выше. В частности, влияние окиси дейтерия на pK субстратов или ионогенных форм фермента, принимающих участие в связывании субстрата, так же как влияние окиси дейтерия на конформацию фермента, может приводить к изменениям константы Михаэлиса. Кроме того, «неспецифические» влияния окиси дейтерия как растворителя на коэффициенты активности субстрата и (или) активного центра фермента (что проявляется, например, в различных растворимостях субстрата в воде и в окиси дейтерия) могут на 30—40% изменять константу Михаэлиса.

в) *Стерические эффекты.* Возможно, что небольшое различие в эффективных радиусах водорода и дейтерия может приводить к различиям в связывании за счет чисто стерических эффектов. В настоящее время мало известно о силовых константах и возможной жесткости активных центров ферментов, чтобы с какой-либо определенностью можно было сказать, важен ли этот эффект. Однако тот факт, что стерические изотопные эффекты наблюдаются только в неферментативных реакциях с чрезвычайно строгими стерическими требованиями, и определенная вероятность того, что активные центры ферментов имеют хоть малую степень конформационной подвижности, позволяют заключить, что небольшое стерическое различие между водород- и дейтерийсодержащими молекулами не должно заметно сказываться на константе связывания.

г) *Поляризуемость.* Несколько большая поляризуемость связей с водородом по сравнению со связями с дейтерием может привести к несколько меньшему связыванию дейтерированных соединений, однако ожидаемые величины этих эффектов должны быть даже меньше, чем величины стерических эффектов, и они лежат, по-видимому, в пределах экспериментальных ошибок большинства определений констант связывания.

е) *Напряжение.* Если образование фермент-субстратного комплекса включает использование связывающих сил для активации субстрата и принудительного перевода его в положение, приближающееся к переходному состоянию, то конечное изменение частот и нулевых энергий связей с водородом должно приводить к изотопному эффекту константы связывания субстрата. Другими словами, такая реакция, как удаление протона, может уже в некоторой степени протекать в комплексе Михаэлиса (гл. 5). Такой изотопный эффект был бы фактически доказательством существования напряжений в фермент-субстратном комплексе, если можно было быть твердо уверенным, что он не вызывается наличием заметного кинетического члена в константе Михаэлиса или стерическими эффектами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wiberg K. B., Chem. Rev., 55, 713 (1955); Melander L., Isotope Effects on Reaction Rates, The Ronald Press Company, New York, 1960; Bell R. P., The Proton in Chemistry, chap. XI, Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1959; Wiberg K. B., Physical Organic Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1964, p. 351 — 364.
2. Reitz O., Kopp J., Z. Physik. Chem., 184 A, 429 (1939).
3. Seltzer S., Hamilton G. A., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., 81, 4018 (1959).
4. Lewis E. S., Funderburk L. H., J. Am. Chem. Soc., 89, 2322 (1967); Lewis E. S., Robinson J. K., ibid., 90, 4337 (1968).
5. Anbar M., Meyerstein D., J. Phys. Chem., 68, 3184 (1964).

6. Cram D. J., Scott D. A., Nielsen W. D., J. Am. Chem. Soc., 83, 3696 (1961); Ford W. T., Graham E. W., Cram D. J., *ibid.*, 89, 4661 (1967).
7. Jencks W. P., Carriuolo J. J. Am. Chem. Soc., 82, 675 (1960).
8. Gross Ph., Steiner H., Suess H., Trans. Faraday Soc., 32, 883 (1936).
9. Bigeleisen J., J. Chem. Phys., 17, 675 (1949); Bigeleisen J., Wolfsberg M., Advan. Chem. Phys., 1, 15 (1958).
10. Westheimer F. H., Chem. Rev., 61, 265 (1961).
11. Melander L., Isotope Effects on Reaction Rates, The Ronald Press Company, New York, 1960.
12. Kreevoy M. M., J. Chem. Ed., 41, 636 (1964).
13. Swain C. G., Stivers E. C., Reuwer J. F., J., Schaad L. J., J. Am. Chem. Soc., 80, 5885 (1958).
14. Bell R. P., The Proton in Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., p. 183, 1959.
15. Rule C. K., La Mer V. K., J. Am. Chem. Soc., 60, 1974 (1938).
16. Bell R. P., Kuhn A. T., Trans. Faraday Soc., 59, 1789 (1963).
17. Bunton C. A., Shiner V. J., Jr., J. Am. Chem. Soc., 83, 42 (1961).
18. Lienhard G. E., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 88, 3982 (1966).
19. Bunton C. A., Shiner V. J., Jr., J. Am. Chem. Soc., 83, 3207, 3214 (1961).
20. Halevi E. A., Progr. Phys. Org. Chem., 1, 109 (1963).
21. Thornton E. R., Ann. Rev. Phys. Chem., 17, 349 (1966).
22. Streitwieser A., Jr., Jagow R. H., Fahey R. C., Suzuki S., J. Am. Chem. Soc., 80, 2326 (1958).
23. Mocek M. M., Stewart R., Can. J. Chem., 41, 1641 (1963).
24. Bell R. P., Miller W. B. T., Trans. Faraday Soc., 59, 1147 (1963).
25. Bell R. P., Crooks J. E., Trans. Faraday Soc., 58, 1409 (1962).
26. Traficante D. D., Maciel G. E., J. Am. Chem. Soc., 87, 4917 (1965).
27. Jones J. M., Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 82, 6322 (1960).
28. Bender M. L., Feng M. S., J. Am. Chem. Soc., 82, 6318 (1960).
29. Halevi E. A., Margolin Z., Proc. Chem. Soc., 1964, 174.
30. Shiner V. J., Jr., J. Am. Chem. Soc., 82, 2655 (1960).
31. Bartell L. S., Roskos R. R., J. Chem. Phys., 44, 457 (1966).
32. Ingold C. K., Raisin C. G., Wilson C. L., J. Chem. Soc., 1936, 915.
33. Mislou K., Graeve R., Gordon A. J., Wahl G. H., Jr., J. Am. Chem. Soc., 86, 1733 (1964).
34. Swain C. G., Bader R. F. W., Tetrahedron Letters, 10, 182 (1960).
35. Davies D. H., Benson G. C., Can. J. Chem., 43, 3100 (1965).
36. Wu Y.-C., Friedman H. L., J. Phys. Chem., 70, 166 (1966).
37. Salomaa P., Aalto V., Acta Chem. Scand., 20, 2035 (1966).
38. Kresheck G. C., Schneider H., Scheraga H. A., J. Phys. Chem., 69, 3132 (1965).
39. Ben-Naim A., J. Chem. Phys., 42, 1512 (1965).
40. Swain C. G., Thornton E. R., J. Am. Chem. Soc., 84, 822 (1962); Clarke G. A., Williams T. R., Taft R. W., *ibid.*, 84, 2292 (1962).
41. Ramette R. W., Sandford R. W., Jr., J. Am. Chem. Soc., 87, 5001 (1965).
42. Bigeleisen J., Pure Appl. Chem., 8, 217 (1964).
43. Bell R. P., Discussions Faraday Soc., 39, 16 (1966).
44. O'Ferrall R. A. M., Kouba J., J. Chem. Soc., 1967 B, 985.
45. Albery W. J., Trans. Faraday Soc., 63, 200 (1967).
46. Willi A. V., Wolfsberg M., Chem. Ind. (London), 1964, 2097.
47. Wiberg K. B., Motell E. L., Tetrahedron Letters, 19, 2009 (1963).
48. Bell R. P., Goodall D. M., Proc. Roy. Soc. (London), 294 A, 273 (1966); Longridge J. L., Long F. A., J. Am. Chem. Soc., 89, 1292 (1967).
49. Chiltz G., Eckling R., Goldfinger P., Huybrechts G., Johnston H. S., Meyers L., Verbeke G., J. Chem. Phys., 38, 1053 (1963).
50. Bell R. P., Trans. Faraday Soc., 57, 961 (1961).
51. Streitwieser A., Jr., Lawler R. G., Perrin C., J. Am. Chem. Soc. 87, 5383 (1965).
52. Bader R. F. W., Can. J. Chem., 42, 1822 (1964).
53. Hawthorne M. F., Lewis E. S., J. Am. Chem. Soc., 80 4296 (1958).
54. Winstein S., Takahashi J., Tetrahedron Letters, 2, 316 (1958).
55. Collins C. J., Rainey W. T. Smith W. B., Kaye I. A., J. Am. Chem. Soc., 81, 460 (1959).
56. Day R. J., Reilley C. N., J. Phys. Chem., 71, 1588 (1967).
57. Kreilick R. W., Weissman S. I., J. Am. Chem. Soc., 88, 2645 (1966).
58. Johnson S. L., Advan. Phys. Org. Chem., 5, 237 (1967).
59. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Am. Chem. Soc., 83, 1743 (1961).
60. Fedor L. R., Bruice T. C., J. Am. Chem. Soc., 86, 4117 (1964).
61. Kresge A. J., Pure Appl. Chem., 8, 243 (1964).
62. Kreevoy M. M., Steinwand P. J., Kayser W. V., J. Am. Chem. Soc., 88, 124 (1966).
63. Gold V., Kessick M. A., J. Chem. Soc., 1965, 6718.
64. Kresge A. J., Allred A. L., J. Am. Chem. Soc., 85, 1541 (1963); Gold V., Proc. Chem. Soc., 1963, 141; Heinzing K., Weston R. E., Jr., J. Phys. Chem., 68, 744 (1964).

65. *Salomaa P., Kankaanperä A., Lajunen M.*, Acta Chem. Scand., **20**, 1790 (1966); *Kresge A. J., Chiang Y.*, J. Chem. Soc., **1967 B**, 58; *Gold V., Waterman D. C. A.*, Chem. Commun, **1967**, 40.
66. *Kresge A. J., Preto R. J.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 4593 (1965).
67. *Haslam J. L., Eyring E. M., Epstein W. W., Jensen R. P., Jaget C. W.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 4247 (1965).
68. *Steffa L. J., Tornton E. R.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 6149 (1967).
69. *McDonough L., Dauben H. J., Jr.*, cited by *Wiberg K. B., Motell E. L.*, Tetrahedron Letters, **19**, 2009 (1963).
70. *Grimison A.*, J. Phys. Chem., **67**, 962 (1963).
71. *Long R. W., Hilderbrand J. H., Morrell W. E.*, J. Am. Chem. Soc., **65**, 182 (1943).
72. *Singh S., Rao C. N. R.*, Can J. Chem., **44**, 2611 (1966).
73. *Strittmatter P.*, J. Biol. Chem., **237**, 3250 (1962).
74. *Glasoe P. K., Long F. A.*, J. Phys. Chem., **64**, 188 (1960).
75. *Kosicki G. W., Srere P. A.*, J. Biol. Chem., **236**, 2566 (1961).
76. *Hermans J., Scheraga H. A.*, Biochim. Biophys. Acta, **36**, 534 (1959).
77. *Cathou R. E., Hammes G. G.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 4674 (1965); *French T. C., Hammes G. G.*, *ibid.*, p. 4669.
78. *Pocker Y., Strom D. R.*, Biochemistry, **7**, 1202 (1968).
79. *Gallagher K. J.*, in (Hadri D., ed.) «Hydrogen Bonding», Pergamon Press, New York, 1959, p. 45.
80. *Kaplan M. M., Flavin M.*, J. Biol. Chem., **240**, 3928 (1965).
81. *Jones P. M. S., Hutcheson C. G.*, Nature, **213**, 490 (1967).

НАПРЯЖЕНИЯ, ДЕФОРМАЦИИ И КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ*

В настоящее время не вызывает сомнений, что такие факторы, как эффект сближения, ковалентный катализ, общий кислотно-основной катализ, проявляются во многих ферментативных реакциях, однако проведенные оценки ускорений, вызываемых этими факторами, показывают, что они, по-видимому, не могут полностью объяснить высокие *специфические* ускорения реакций, вызываемые ферментами. Это ведет к поиску других факторов, которые могли бы объяснить эффективность ферментативного катализа. Прежде чем обсуждать гипотетические механизмы катализа, которые в настоящее время не имеют химического обоснования, весьма полезно рассмотреть старую гипотезу ферментативных ускорений, которая предполагает, что в наблюдаемых специфических ускорениях играет заметную роль деформация субстрата, фермента или того и другого вместе. По-видимому, этот процесс в известной степени аналогичен тем конформационным изменениям ферментов, которые наблюдаются в присутствии субстратов, активаторов и ингибиторов и которые в рамках «аллостерической» гипотезы и гипотезы «индуцированного соответствия» важны для осуществления контроля и специфичности ферментативного катализа.

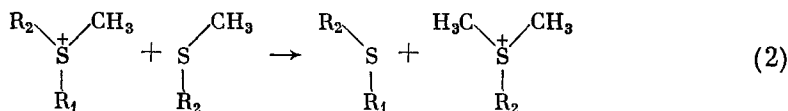
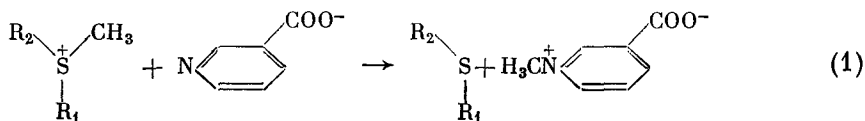
Основная причина того, что гипотезе напряжений и деформаций не уделяли должного внимания, заключается в том, что трудно найти экспериментальные методы, чтобы ее подтвердить или отвергнуть. В настоящее время нет строгих экспериментальных свидетельств в пользу того, что напряжения и деформации играют важную роль в ферментативном катализе, однако можно показать, что эти факторы почти определенно имеют место в катализе, осуществляемом ферментами. Существуют два наиболее важных теоретических соображения, указывающих на то, что гипотеза напряжений и деформаций заслуживает более пристального внимания; во-первых, трудно удовлетворительно объяснить природу ферментативного катализа некоторых реакций при помощи каких-либо других известных механизмов; во-вторых, известен факт, что ферментативная специфичность чаще всего проявляется в максимальных скоростях процесса, а не в связывании субстратов ферментом, как можно было ожидать. Кроме того, необходимо найти объяснение тому факту, что ферменты представляют собой большие молекулы определенной структуры, которая должна быть интактна, чтобы проявилась каталитическая активность.

А. КАТАЛИЗ РЕАКЦИЙ ЗАМЕЩЕНИЯ

Для некоторых простейших реакций очень трудно дать объяснения высоких скоростей с точки зрения механизмов катализа, обсужденных ранее. В этом отношении особые трудности представляют бимолекулярные реакции замещения, в которых общий кислотно-основной катализ или вносит небольшой вклад, или вообще невозможен. Такими реакциями являются, например, образование тригонеллина из S-аденозилметионина [2] {схема (1)} и перенос

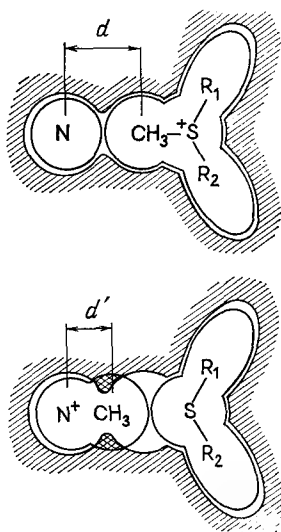
* Для более детального ознакомления см. [1].

метильной группы от S-аденозилметионина на тиоэфирную группу метионина с образованием нового сульфониевого иона {схема (2)} [3].



Увеличение скорости за счет индуцирования напряжения является логичным механизмом, объясняющим ускорения в таких реакциях. Простейший механизм в этом случае заключается в том, что происходит внедрение нуклеофильного реагента в молекулу донора метильной группы с частичным преодолением сил отталкивания Ван-дер-Ваальса, создающих большую часть энергетического барьера реакции. Однако возможны также и другие механизмы катализа, которые могут быть определены широким термином «напряжение».

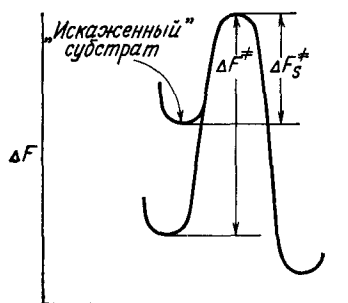
Можно показать, что для многих обратимых реакций *должно* иметь место индуцирование напряжения в фермент-субстратном комплексе, которое приводит к ускорению реакции, по крайней мере в одном направлении. Предположим, что в случае реакции переноса метильной группы от сульфониевого иона субстраты совершенно строго соответствуют жесткому активному центру с межъядерным расстоянием d между нуклеофилом и атомом углерода метильной группы, которое определяется суммой вандерваальсовых радиусов реагирующих атомов (рис. 1). Продукты реакции не могут совершенно точно соответствовать тому же активному центру, что и субстраты. В продуктах реакции метильная группа придвинута ближе к нуклеофилу и межъядерное расстояние становится равным d' . Комплекс фермент-продукт, таким образом, дестабилизируется за счет стерических затруднений, испытываемых метильной группой в новом положении при взаимодействии с группами фермента, на рисунке заштрихованными сеткой; это приводит к потере энергии связывания метильной группы по сравнению с ее нормальной позицией на активном центре. Следствием этой ситуации является то, что продукты могут связаться с ферментом более прочно, если они испытывают такие искажения, которые приближат их к структуре субстратов. Это значит, что энергия связывания с ферментом будет обеспечивать движущую силу таких искажений. Таким образом, при связывании продуктов реакции будет наблюдаться тенденция к перемещению метильной группы от атома азота к тиоэфиру, что будет облегчать реакцию в обратном направлении. И наоборот, если жесткий активный центр строго соответствует продуктам реакции, то будет наблюдаться плохое соответствие активного центра исходным веществам, и это должно обеспечивать возникновение



Р и с. 1. Схема, показывающая, что если активный центр фермента имеет структуру, которая обеспечивает оптимальное соответствие для субстратов (нуклеофила и сульфониевого иона), то он не будет иметь оптимального соответствия (т. е. будет наблюдаться тенденция к индуцированию напряжений и искажений) для продуктов реакции вследствие изменения длин связей, углов между связями и положения заряда.

искажений исходных соединений с приближением их к структуре, соответствующей продуктам реакции. Если активный центр будет иметь промежуточную структуру, то претерпевать искажения будут как исходные соединения, так и продукты реакции, и скорость реакции будет увеличиваться для обоих направлений.

Перемещение реагирующих атомов один к другому и насильное вовлечение молекул в реакцию не являются единственным путем, по которому



Р и с. 2. Диаграмма, показывающая, что индуцирование напряжения или искажения в субстрате должно приводить к частичному перемещению вдоль координаты реакции к переходному состоянию.

связывание пиридиниевого или сульфониювого иона, но в то же время это будет создавать энергетически неблагоприятное окружение для незаряженного пиридина или исходного тиоэфира, что в свою очередь облегчит перенос метильной группы на акцептор с образованием положительного заряда. Если активный центр не является жестким и необходима определенная энергия деформации для связывания продуктов реакции, то эта энергия аналогичным образом будет способствовать возвращению активного центра к его начальной структуре и облегчать протекание реакции в обратном направлении.

Эти аргументы можно обобщить следующим образом: единственная структура активного центра обычно не может обеспечить оптимальное соответствие как для субстратов, так и для продуктов реакции. Различия в структуре реагирующих веществ и продуктов реакции и сопротивление активного центра изменениям будут приводить к тому, что энергия связывания субстратов вызовет появление напряжения в продуктах реакции, и наоборот. Наиболее желательная ситуация, с точки зрения возможности ускорения реакции фермент-субстратного комплекса, возникает в том случае, если активный центр структурно имеет наибольшее сродство к *переходному состоянию*. Индуцирование напряжения в фермент-субстратном комплексе включает преодоление части энергетического и энтропийного барьеров реакции за счет перенесения субстрата частично вдоль координаты реакции к переходному состоянию и, таким образом, ведет к уменьшению наблюдаемой свободной энергии активации (рис. 2) *

Характерный пример индуцирования напряжения в продукте реакции,

* Сравнение энергетических барьеров катализируемой и некатализируемой реакций представляет определенные трудности, поскольку катализируемая реакция может протекать по другому механизму и подчиняться закону скорости другого порядка. Однако тот экспериментальный факт, что катализ наблюдается, означает, что свободная энергия активации в присутствии катализатора при данных условиях эксперимента меньше, чем свободная энергия активации для того же или для любого другого механизма в отсутствие катализатора.

который связывается с центром, соответствующим исходному соединению, был найден при изучении зрительного пигмента иодопсина. Фотоизомеризация 11-*цис*-ретинала (альдегида витамина А), который связан со специфическим центром на белке в иодопсине и в родственном каротеноид-протеине родопсине [5], в полностью *транс*-изомер является первой стадией зрительного процесса. Если фотоизомеризацию 11-*цис*-ретинала иодопсина проводят при -195°C , а затем систему нагревают до -100°C , образовавшийся *транс*-ретиналь быстро изомеризуется в 11-*цис*-форму с регенерацией нативного иодопсина. Поскольку связывающий центр ретинала в исходном веществе соответствует 11-*цис*-изомеру, а не полностью *транс*-изомеру, взаимодействие этого центра с *транс*-изомером после фотоизомеризации индуцирует напряжение и уменьшает активационный барьер для превращения *транс*-изомера в 11-*цис*-структуру. Индуцирование искажений — также интересный механизм для объяснения необычных спектральных свойств зрительных пигментов и некоторых других нативных каротеноид-протеинов, которые не могут быть строго объяснены другими механизмами [4, 6].

Чтобы уменьшить энергию активации за счет деформационного механизма, необходим источник энергии деформации. Наличие максимального сродства активного центра фермента к переходному состоянию означает, что сродство субстрата и продуктов реакции к активному центру должно быть менее максимального. Энергия напряжения, которое индуцируется в субстрате, оплачивается за счет уменьшения энергии связывания, так что наблюдаемое связывание субстрата будет меньше, чем максимально возможное, при использовании всех связывающих сил на активном центре, оптимально соответствующем субстрату.

Концепция, согласно которой активный центр фермента уменьшает свободную энергию активации, обеспечивая максимальное связывание для переходного состояния, шире, чем термины «напряжение» или «искажение». Невозможно, однако, провести четкую грань между различными механизмами, сущность которых заключается в использовании энергии связывания субстрата для уменьшения свободной энергии активации реакции. Так, электростатическая дестабилизация пиридина или теофира отрицательным зарядом может осуществляться лишь в том случае, если эти группы приходят в соприкосновение с отрицательным зарядом за счет связывающих сил остальной части молекулы. Даже обычный тип напряжения трудно отличить от механизма индуцированной ориентации реагирующих групп; каждая данная молекула проводит разное время в различных конформациях, зависящее от энергий и энтропий каждой конформации, и связывание на активном центре одной из этих конформаций, которая легче всего ведет к образованию переходного состояния, оплачивается менее предпочтительной свободной энергией связывания. Так как ускорение реакции зависит от стабилизации связыванием такой особой конформации, то совершенно безразлично, вызывается ли малая вероятность этой конформации за счет неблагоприятной энтропии или энтальпии. Представление об оптимальном связывании переходного состояния можно даже использовать для объяснения увеличения скорости, которое является результатом сближения двух реагентов из разбавленного раствора на активном центре.

Если комплементарность между активным центром и переходным состоянием является существенной для ферментативного катализа, то нельзя исключить возможность синтеза искусственного фермента за счет конструирования подходящего активного центра. Один из возможных путей заключается в получении антитела к гаптенной группе, которая адекватна переходному состоянию данной реакции. Связывающие центры таких антител должны быть комплементарны переходному состоянию и должны вызывать ускорения за счет перевода связанных субстратов в положение, похожее на переходное состояние.

Б. ПРОЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В МАКСИМАЛЬНЫХ СКОРОСТЯХ

Одну из общих проблем энзимологии составляет выяснение вопроса, почему специфичность ферментативных реакций часто проявляется в максимальных скоростях, т. е. при высоких концентрациях субстрата, при которых фермент насыщен субстратом. Можно было бы ожидать, что специфичность должна проявляться в связывании субстратов, так что плохой субстрат должен слабо связываться с активным центром, но, связавшись, должен реагировать нормально. Модель «замка и ключа» способна объяснить, почему с активным центром фермента связываются субстраты лишь определенной структуры, однако она не может объяснить специфичность в отношении констант скоростей каталитической стадии, что является характерным свойством ферментов. Наиболее непонятное положение существует для субстратов небольших размеров, которые в состоянии связываться, хотя и непрочно, с активным центром и должны бы были претерпевать превращение. Так, фермент гексокиназа катализирует перенос фосфатной группы от АТФ на воду так же, как на гидроксильную группу специфического акцептора — глюкозы, но скорость реакции с водой составляет всего лишь $5 \cdot 10^{-6}$ доли скорости реакции с глюкозой [7]. Совершенно очевидно, что вода в состоянии проникнуть в активный центр фермента, так что малая скорость реакции несомненно связана с низкой реакционной способностью воды в области активного центра. Многие другие ферменты, катализирующие перенос групп, эффективно катализируют перенос на специфические гидроксильные акцепторы, но катализируют слабо или не катализируют вообще перенос на воду.

Один из многих примеров проявления специфичности ферментов в максимальных скоростях реакции, а не в константах связывания был найден при изучении гидролиза центральной пептидной связи в серии синтетических субстратов под действием пепсина (табл. 1) [8]. Максимальные скорости

Таблица 1

Гидролиз пептидов пепсином при pH 4,0 [8]

Пептид ^а	КМ, мМ	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹
Кбз-гли-гис-фен-фен-о-этил	0,80	2,43
Кбз-гис-фен-трип-о-этил	0,23	0,51
Кбз-гис-фен-фен-о-этил	0,18	0,31
Кбз-гис-фен-тир-о-этил	0,23	0,16
Кбз-гис-тир-фен-о-метил	0,68	0,013
Кбз-гис-тир-тир-о-этил	0,24	0,0094
Кбз-гис-фен-лей-о-метил	0,56	0,0025

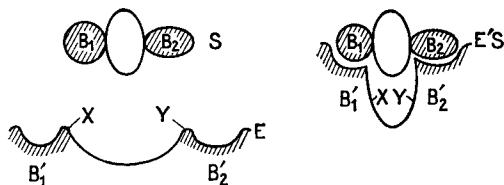
^а Кбз — карбобензокс, гли — глицин, гис — гистидин, фен — фенил-аланин, трип — триптофан, лей — лейцин, тир — тирозин.

гидролиза этих пептидов различаются в 1000 раз, хотя константы Михаэлиса, которые пропорциональны, а возможно, и равны константам диссоциации фермент-субстратного комплекса, изменяются всего лишь в 4 раза. Существует по крайней мере три приемлемых объяснения этого явления: индуцированное соответствие, непродуктивное связывание и ускорение реакции

индуцированием напряжения. По-видимому, не всегда можно провести четкую грань между этими случаями.

1. ТЕОРИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО СООТВЕТСТВИЯ

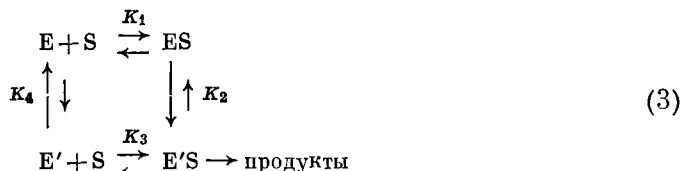
По теории индуцированного соответствия, выдвинутой Кошландом [9, 10], каталитические группы активного центра свободного фермента не находятся в том положении, в котором они осуществляют эффективный катализ. Когда хороший субстрат связывается с ферментом, силы связывания между ферментом и субстратом используются для создания в ферменте энергетически менее предпочтительной, но каталитически активной конформации (рис. 3). Плохой субстрат будет связываться с активным центром, однако



Р и с. 3. Механизм индуцированного соответствия, согласно которому связывание субстрата группами B_1 и B_2 вызывает изменение в конформации фермента, так что группы X и Y активного центра, необходимые для катализа, располагаются соответствующим образом относительно субстрата [1].

не будет иметь необходимых структурных особенностей для конформационного изменения фермента в активную форму и, следовательно, не будет претерпевать превращения.

Индукционное соответствие обеспечивает контроль и специфичность ферментативной реакции, однако оно не включает непосредственного использования связывающих сил для уменьшения активационного барьера реакции. Равновесия и соответствующие свободные энергии этого механизма представлены схемой (3), в которой E — неактивная форма свободного фермента $E'S$ — модифицированный активный фермент, связанный с субстратом. Поскольку E — энергетически предпочтительная форма свободного фермента (свободный фермент каталитически неактивен) и $E'S$ — каталитически активная форма фермент-субстратного комплекса, силы связывания фермента и субстрата должны являться движущей силой энергетически неблагоприятного превращения E в E' . Наблюдаемая энергия связывания субстрата (с образованием $E'S$) должна уменьшиться на эквивалентную величину.



Наблюдаемая свободная энергия связывания субстрата, равная $\Delta F_4 + \Delta F_3$ [индексы соответствуют номерам реакций схемы (3)], всегда будет менее благоприятной, чем ΔF_3 (свободной энергии связывания субстрата с активным центром каталитически активной конформации), на величину, равную ΔF_4 , поскольку ΔF_4 положительно.

Таким образом, индуцированное соответствие приводит: 1) к уменьшению наблюдаемой константы связывания по сравнению с величиной, которая наблюдалась бы в случае строгого соответствия субстрата активному

центру без каких-либо дополнительных конформационных изменений, и 2) к тому, что максимальная скорость реакции оптимальна для специфического субстрата, который может использовать специфические силы связывания для осуществления конформационного изменения. Основным результатом этого процесса заключается в том, что субстратная специфичность проявляется при высоких концентрациях субстрата. Если бы энергия связывания не использовалась для осуществления индуцированного соответствия, то наблюдалось бы более прочное связывание и, следовательно, высокая ферментативная активность со специфическим субстратом в разбавленном растворе.

Эта теория особенно привлекательна для объяснения отсутствия ферментативной активности с небольшими субстратами, такими, как вода, в которых нет групп, способных обеспечить связывание и энергию, необходимые для приведения фермента в активную конформацию. Однако остается по-прежнему непонятным, как этот механизм может приводить к таким большим различиям в скоростях, которые наблюдаются на опыте. Так, для объяснения различия в $5 \cdot 10^{-8}$ раз между водой и глюкозой в реакциях гексокиназы необходимо, чтобы концентрация активного фермента E' в отсутствие специфически индуцирующих сил составляла бы $5 \cdot 10^{-6}$ частей неактивного фермента. Связывание глюкозы должно приводить к превращению фермента в активную форму, что требует более 7 ккал ($29,3 \cdot 10^3$ Дж) свободной энергии. Чтобы получить наблюдаемую энергию связывания, эту энергию

необходимо вычесть из возможной максимальной энергии связывания глюкозы (которая бы соответствовала оптимальному взаимодействию с активным центром). Это достаточно большая цена за специфичность, однако с точки зрения целесообразности это, возможно, необходимо для предотвращения бесполезного гидролиза АТФ. Другие теории не решают аналогичные энергетические проблемы более успешно.

2. ГИПОТЕЗА НЕПРОДУКТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ [11–16]

В соответствии с гипотезой непродуктивного связывания в случае «плохого» субстрата в каталитически неактивном положении оказывается субстрат, а не фермент. Можно допустить, что «хороший» специфический субстрат имеет несколько связывающих центров, которые комплементарны

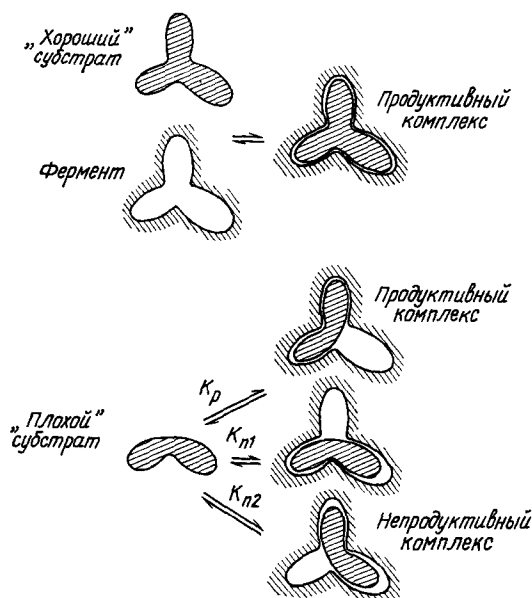


Рис. 4. Схема продуктивного и непродуктивного связывания «хорошего» и «плохого» субстратов.

центрам на ферменте, так что субстрат связывается только в одном активном положении (рис. 4). Плохой субстрат, в котором отсутствует одна или несколько этих связывающих групп или они расположены некомплементарно, может связаться правильно, но может связаться и неправильно с образованием каталитически неактивных фермент-субстратных комплексов (рис; 4). Наблюдаемая максимальная скорость V_{obs} для плохих субстратов будет, таким образом, меньше максимальной скорости для продуктивно связанного субстрата V_p на фактор, соответствующий доли субстрата, который связан

продуктивно [уравнение (4)]:

$$V_{\text{obs}} = V_p \frac{K_p}{K_p + K_{n1} + K_{n2} + \dots + K_{nx}}. \quad (4)$$

Аналогично наблюдаемая константа *связывания* K_{obs} (если она выражена в моль/л) будет больше, чем константа продуктивного связывания K_p , поскольку она включает все возможные способы связывания, как продуктивные, так и непродуктивные [уравнение (5)]:

$$K_{\text{obs}} = K_p + K_{n1} + K_{n2} + \dots + K_{nx}. \quad (5)$$

Если непродуктивное связывание преобладает, константа продуктивного связывания будет так мала, что не будет давать заметного вклада в наблюдаемую константу связывания.

Эту теорию наиболее широко использовали при рассмотрении реакций, катализируемых химотрипсином. Было постулировано, что для субстратов типа $R_1\text{CONHCHR}_2\text{COR}_3$ на ферменте существуют центры связывания ρ_1 , ρ_2 , ρ_3 , которые взаимодействуют с R_1 , R_2 , R_3 соответственно. В случае хорошего субстрата имеет место правильное попарное соответствие групп субстрата и центров на ферменте; в случае плохого субстрата возникают неправильные взаимодействия, приводящие к непродуктивному связыванию. Эта теория способна дать согласованную картину многих каталитических свойств рассматриваемого фермента [14—16]. Хорошо известный факт, что производные D-аминокислот гидролизуются очень медленно или вообще не гидролизуются под действием химотрипсина, хотя их константы связывания очень близки к константам, наблюдаемым для соответствующих L-субстратов, является, по-видимому, следствием непродуктивного связывания. Интересно отметить, что ацил-ферментные промежуточные соединения, образованные D-субстратами, претерпевают гидролиз более медленно, чем промежуточные соединения неспецифических субстратов, такие, как ацетил- или ацетилглицил-химотрипсин; кроме того, чем быстрее претерпевает гидролиз промежуточное соединение, образованное из нормального L-субстрата, тем медленнее гидролизует D-субстрат [17]. Можно допустить, что неспецифический субстрат укрепляется на активном центре в нескольких положениях и только некоторые из них ведут к гидролизу. Высокоспецифичный L-субстрат связывается правильно и быстро претерпевает гидролиз, в то время как соответствующий D-субстрат связывается преимущественно неправильно, так что он почти никогда не находится в положении, обеспечивающем гидролиз. С другой стороны, поскольку трудно объяснить очень низкую скорость гидролиза ацетил-фермента просто малой вероятностью конформации, которая ведет к гидролизу, необходимо допустить, что специфический L-субстрат может вызвать конформационное изменение фермента, которое облегчает гидролиз за счет правильной ориентации каталитических групп или индуцирования напряжения, в то время как D-субстраты вызывают конформационное изменение, которое затрудняет реакцию.

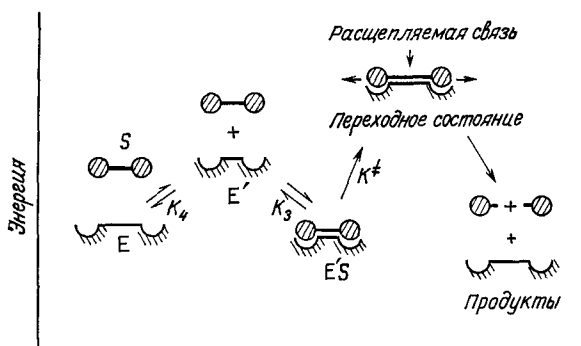
Чтобы объяснить низкую реакционную способность воды в реакции гексокиназы теорией непродуктивного связывания, необходимо принять, что вода связывается в $2 \cdot 10^5$ раз чаще неправильно, чем правильно. Это трудно понять, поскольку для большинства химических реакций характерны много меньшие ориентационные требования. Для правильного связывания гидроксильного субстрата должен существовать барьер свободной энергии более чем 7 ккал/моль ($29,3 \cdot 10^3$ Дж/моль), и энергия связывания глюкозы должна быть достаточной для преодоления этого барьера. Величина этого барьера указывает, по-видимому, на существование специфического стерического или конформационного препятствия для правильного связывания воды.

3. ТЕОРИЯ НАПРЯЖЕНИЯ ИЛИ ДЕФОРМАЦИИ

В соответствии с теорией напряжения или деформации связывающие силы между субстратом и ферментом непосредственно используются для создания напряжения или деформации, которые облегчают реакцию. Если активный центр фермента жесткий, то, чтобы субстрат мог связаться с ним, он должен претерпеть деформацию таким образом, чтобы его структура максимально приблизилась к структуре переходного состояния реакции; энергия связывания является источником тех сил, которые позволяют субстратам связываться в искаженной конфигурации. Все это представлено на схеме (6), в которой S — нормальный субстрат, S' — искаженный субстрат, а E — фермент, способный связывать только искаженный субстрат.



Наблюдаемая энергия связывания ΔF_1 является алгебраической суммой энергии, требуемой на искажение субстрата ΔF_2 , и энергии связывания искаженного субстрата ΔF_3 . Наблюдаемая энергия связывания меньше



Р и с. 5. Схема, показывающая, как индуцируемое субстратом конформационное изменение фермента можно использовать для облегчения протекания реакции, «растягивая» субстрат.

максимальной энергии связывания, которая наблюдалась бы в отсутствие напряжения или искажения, на величину, требуемую для возникновения искажения (ΔF_2). Таким образом, скорость реакции растет за счет уменьшения связывания.

В случае если конформационно лабилен фермент, а субстрат обладает относительно жесткой структурой, схема реакции та же, что и для теории индуцированного соответствия [схема (3)]. Наиболее стабильное состояние фермента не имеет оптимального соответствия субстрату, но зато по комплементарным свойствам ближе к переходному состоянию. Чтобы возможно было образование комплекса с субстратом, фермент должен претерпеть энергетически неблагоприятную деформацию. Тенденция фермента возвратиться в свое начальное низкоэнергетическое состояние будет обеспечивать движущую силу перевода субстрата в структуру, близкую к структуре переходного состояния. На рис. 5 приведена схема такого процесса. В данном случае тенденция искаженного фермента E' возвратиться в недеформированное состояние E облегчает реакцию, «растягивая» связи субстрата. Так же как в случае индуцированного соответствия, наблюдаемая энергия связы-

вания субстрата меньше энергии, которая необходима для связывания с недеформированным активным центром, на величину, требуемую для искажения фермента. Различие между теорией индуцированного соответствия и теорией напряжения заключается в том, что по теории индуцированного соответствия энергия связывания используется для ориентации каталитических групп в требуемое положение относительно хорошего субстрата, обеспечивая специфичность при высоких концентрациях субстрата, в то время как по теории напряжения энергия связывания непосредственно используется для уменьшения свободной энергии активации реакции, также обеспечивая специфичность при высоких концентрациях субстрата.

Фактически ни один из приведенных выше механизмов гипотезы напряжения не соответствует действительности, поскольку ни субстрат, ни фермент не являются жесткими молекулами. В реальной системе, по-видимому, претерпевают искажение *как субстрат, так и фермент*, и наблюдаемый эффект должен быть промежуточным между двумя случаями, описанными выше. Фермент, по-видимому, может иметь высокую степень конформационной подвижности в отношении некоторых перемещений из-за слабости отдельных связей, определяющих его конформацию. Поэтому возникает вопрос, будет ли энергия искажения белка достаточной, чтобы вызвать существенное ускорение реакции, поскольку для многих типов перемещений боковых цепей нельзя ожидать больших силовых констант. Легче всего представить индуцированное белком искажение, которое включает сжатие и изменение углов между связями. Так, можно представить углубления на поверхности фермента, которые ведут к искажению углов между связями за счет изгибания связей у центрального атома, чтобы образовать гидрофобные или другие связи с группами, окружающими этот атом. Искажение, которое включает разрушение α -спирали или другой кооперативной структурной единицы белка или которое ведет к образованию незанятой полости, по-видимому, требует большой энергии. Фактически гипотеза искажений дает рациональное объяснение тому факту, что ферменты являются большими молекулами, величина которых существенно превосходит размеры, необходимые для локализации каталитических групп; по-видимому, интактная трехмерная структура определенного размера и жесткости необходима для обеспечения соответствия и силовых констант для индуцирования напряжения.

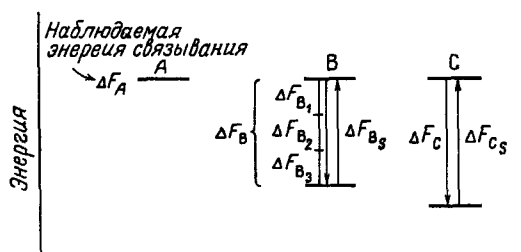
В терминах теории напряжения большая активность гексокиназы в реакции с глюкозой по сравнению с водой должна вызываться использованием специфических сил связывания молекулы глюкозы для индуцирования напряжения в фермент-субстратном комплексе, облегчающего перенос фосфата от АТФ. В случае воды такое специфическое связывание отсутствует, реакция не может ускоряться аналогичным образом и протекает более медленно.

В. НЕКОТОРЫЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ТЕОРИИ НАПРЯЖЕНИЯ

1. ЭСТЕРАЗА И ХИМОТРИПСИН

Существует много экспериментальных наблюдений, которые удовлетворительно можно объяснить с точки зрения теории напряжения, однако ни одно из них не служит строгим обоснованием теории. Наиболее интересной является найденная Хофсти закономерность, что максимальные скорости гидролиза замещенных фениловых эфиров $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOC}_6\text{H}_4\text{COO}^-$ под действием эстеразы печени и химотрипсина возрастают с увеличением длины цепи ацильной части субстрата [18]. В определенных пределах это происходит при относительно небольшом изменении величины константы Михаэлиса.

Таким образом, увеличение длины углеводородной цепи, которое мало сказывается на химической реакционной способности эфиров и должно было бы приводить только к более прочному связыванию, обуславливает увеличение скорости атаки ацильной группы в ферментативной реакции. В терминах теории напряжения [19] это указывает на то, что энергия взаимодействия углеводородной цепи с белком используется для индуцирования напряжения в фермент-субстратном комплексе, как это схематически показано на рис. 6. Предположим, что субстрату с короткой цепью соответствует определенная энергия связывания ΔF_A . Более длинный субстрат должен иметь дополнительную энергию связывания ΔF_B за счет гидрофобного взаимодействия углеводородной цепи. Если эта энергия используется для индуцирования напряжения ΔF_{B_S} и уменьшения свободной энергии активации, то на такую же величину уменьшится вклад в константу связывания;



Р и с. 6. Схема, показывающая, как силы фермент-субстратного связывания можно использовать для индуцирования напряжения в фермент-субстратном комплексе.

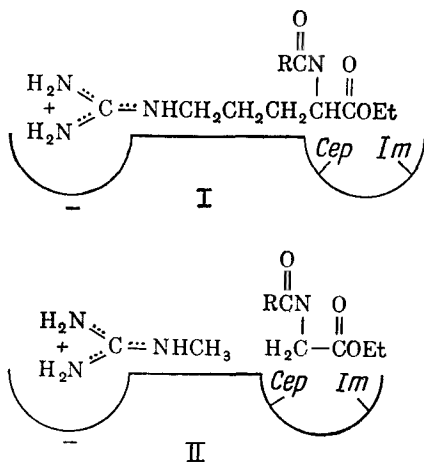
если ΔF_B будет равно ΔF_{B_S} , то наблюдаемая энергия связывания будет той же, что и для субстрата с короткой углеводородной цепью ΔF_A . Для более длинной цепи большая энергия связывания ΔF_C может быть превращена в большую энергию напряжения ΔF_{C_S} , давая дальнейшее увеличение скорости реакции. Наблюдаемое увеличение скорости с увеличением длины цепи происходит на величину, которую следовало бы ожидать, если бы энергия гидрофобного связывания каждой дополнительной метиленовой группы непосредственно использовалась для уменьшения свободной энергии активации, а не для увеличения связывания. Для объяснения этих наблюдений с точки зрения теории индуцированного соответствия необходимо постулировать, что увеличение длины цепи приводит к прогрессивно лучшему соответствию каталитических групп относительно ацильной группы субстрата. Теория непродуктивного связывания требует, чтобы меньшие субстраты связывались неправильно и чтобы с увеличением цепи прогрессивно большая доля субстрата связывалась продуктивным образом.

Недавно Кейн и Ветлауфер показали, что скорости деацилирования серии ацилхимотрипсинов $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO} - \text{Enz}$ также увеличиваются с увеличением длины цепи ацильной группы. Уменьшение на $1,6$ ккал/моль ($6,7 \cdot 10^3$ Дж/моль) свободной энергии активации при переходе от двух- к шестиуглеродным соединениям является следствием *увеличения* на $10,1$ ккал/моль ($42,4 \cdot 10^3$ Дж/моль) энтальпии активации и уменьшения на $11,7$ ккал/моль ($49,1 \cdot 10^3$ Дж/моль) энтропийного члена активационного барьера [20]. Эти величины слишком большие, чтобы их можно было объяснить каким-либо процессом, не включающим изменений в конформации фермента; возможно, они связаны с изменениями в структуре растворителя, которые вызывают взаимокомпенсирующие изменения в энтальпии и энтропии. Уменьшение свободной энергии активации для субстратов с более длинной углеводородной цепью можно объяснить либо индуцированным соответствием каталитических групп, либо механизмом напряжения. Значительно большие различия между

скоростями стадии деацилирования некоторых специфических и неспецифических субстратов связаны с очень малыми изменениями в энтальпии, но с существенными различиями в энтропии активации [21]. Исследования Кейна и Ветлауфера показывают, что кажущееся отсутствие разницы в энтальпиях для специфических субстратов может быть результатом уменьшения энтальпии активации за счет эндотермического конформационного изменения фермента в присутствии специфических субстратов.

2. ТРИПСИН

Свидетельство другого типа, указывающее на участие нереагирующей части субстрата в каталитическом процессе, было найдено при изучении гидролиза этилового эфира ацетилглицина под действием трипсина. В присутствии иона метилгуанидина наблюдается 7-кратное увеличение скорости реакции. Нормальные специфические субстраты трипсина содержат катионную группу, которая, возможно, взаимодействует с анионным центром на ферменте, как это показано для этилового эфира бензоиларгинина (I). Этиловый эфир ацетилглицина — меньший по размерам и незаряженный субстрат — не может взаимодействовать с этим анионным центром и претерпевает гидролиз в 10^8 раз медленнее, чем специфический субстрат. Однако если метилгуанидиновая группа взаимодействует с этим центром (II), то происходит небольшое восстановление нормальной активности

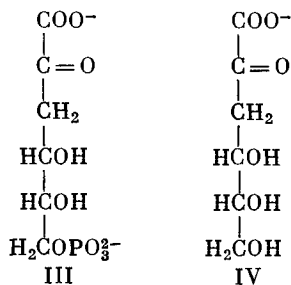


Этот и аналогичные результаты, которые были получены для некоторых других ферментов, показывают, что структурная часть нормального субстрата, которая ответственна за специфичность, взаимодействует с ферментом, вызывая изменения в геометрии системы, которые приводят либо к правильной ориентации каталитических групп относительно субстрата, либо к индуцированию напряжения в реагирующих связях. Интересно отметить, что ион метилгуанидина вызывает также 6-кратное увеличение скорости алкилирования иодацетамидом имидазольной группы в активном центре трипсина [22].

3. 2-КЕТО-3-ДЕЗОКСИ-6-ФОСФОГЛЮКАНОАЛЬДОЛАЗА

Этот фермент является другим примером, где ферментативная активность зависит от присутствия группы (в этом случае фосфатного эфира), которая расположена на некотором расстоянии от реагирующих атомов [23]. Фермент

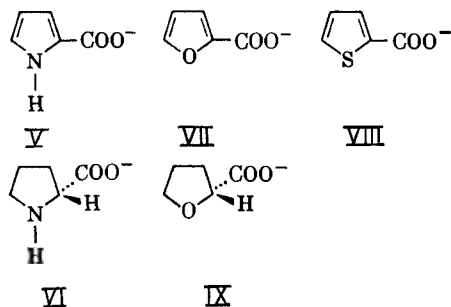
катализирует реакцию субстрата IV (не содержащего фосфатной группы) более чем в 10 000 раз менее эффективно, чем реакцию нормального субстрата III. Можно ожидать, что дефосфорилированное соединение связывается в правильной ориентации, поскольку на молекуле сахара существует несколько возможных специфических центров взаимодействия. Это подтверждается его реакцией с ферментом при низких концентрациях с образованием ковалентной иминной связи с активным центром, что, вероятно, является первой стадией нормального каталитического процесса



Необходимость присутствия фосфатной группы для проявления активности наиболее просто интерпретируется, если допустить, что эта группа действует как «рычаг» для осуществления индуцированного напряжения в фермент-субстратном комплексе, однако возможны и другие интерпретации этого явления в терминах гипотез индуцированного соответствия или непродуктивного связывания.

4. ИНГИБИРОВАНИЕ АНАЛОГАМИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ

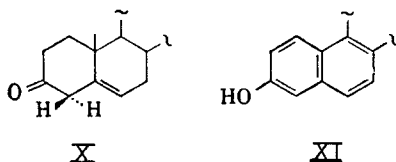
Если за счет энергии связывания происходит искажение субстрата в состояние, напоминающее переходное, то это эквивалентно утверждению, что переходное состояние связывается с активным центром более эффективно, чем субстрат. Поэтому соединения, которые являются аналогами переходного состояния, также должны связываться с ферментом более эффективно, чем субстрат. Существует несколько свидетельств, что это может иметь место. Пролинарацемаза ингибируется пиррол-2-карбоновой кислотой (V) в концентрациях, в 160 раз меньших, чем пролином (VI). Фуран-2-карбоновая кислота (VII) и тиофен-2-карбоновая кислота (VIII)



также являются хорошими ингибиторами, в то время как тетрагидрофуран-2-карбоновая кислота (IX), которая наиболее близка по структуре к пролину, не является ингибитором. В переходном состоянии реакции пролинарацемазы гибридизация α -атома углерода несомненно приближается к sp^2 -гибридизации и переходное состояние является более плоским, чем исходное, имеющее тетраэдрический атом углерода, поэтому сильное ингибирование плоскими

ароматическими молекулами вполне согласуется с тем, что можно ожидать, если фермент искажает субстрат, приближая его к плоскому переходному состоянию [24]. 160-кратное различие в связывании соответствует разнице в свободной энергии 3000 кал/моль ($12,6 \cdot 10^3$ Дж/моль), которая может быть использована для искажения субстрата.

Аналогичное явление обнаружено при изучении Δ^5 -3-кетостероидизомеразы, которая катализирует удаление протона из положения 4 субстрата Δ^5 -андростен-3,17-диона (X), вероятно, через достижение почти плоского переходного состояния



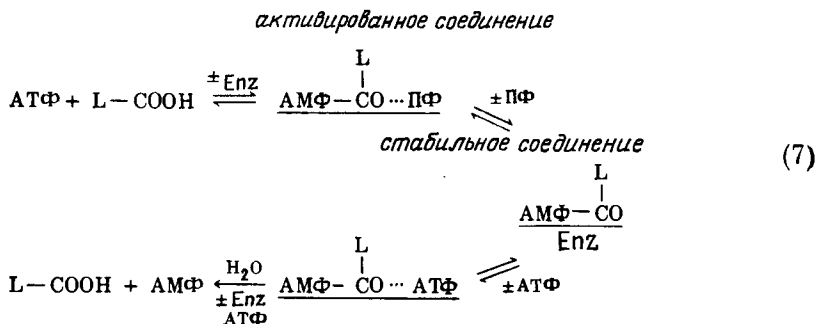
Этот фермент сильно ингибируется плоской молекулой 17- β -дигидроэквилинином (XI) с K_i , равной $6,3 \cdot 10^{-6}$ М, которая много меньше, чем K_M для этого субстрата, равная $3,2 \cdot 10^{-4}$ М. Более того, субстраты, которые претерпевают изомеризацию с максимальной скоростью реакции, меньшей чем соединение X, имеют приблизительно в 10 раз меньшие значения K_M [25]. Сильное ингибирование соединением XI и родственными ингибиторами может быть вызвано их сходством с почти плоским переходным состоянием. Более высокое значение K_M для соединения X, чем для менее эффективных субстратов, может отражать большее превращение энергии связывания в энергию напряжения в случае субстрата X, если величина K_M действительно характеризует относительную связывающую способность субстратов.

5. АКТИВАЦИЯ КОСУБСТРАТАМИ

Для многосубстратных ферментов можно ожидать, что эффективная структура активного центра будет зависеть от присутствия субстратов, так что реакционная способность одного субстрата будет зависеть от присутствия другого, даже если между этими субстратами не будет происходить прямой реакции с преобразованием ковалентных связей. Существует много ферментов, которые требуют присутствия всех или нескольких субстратов для проявления ферментативной активности в частичных реакциях или реакциях обмена. Если этот механизм необходим для проявления специфичности фермента, можно ожидать, что индуцирование напряжения или соответствия присутствием второго субстрата будет приводить к увеличению реакционной способности первого субстрата как по отношению к малым ненормальным реагентам, так и по отношению к нормальному реагенту. Возможный пример такого поведения был найден при изучении фермента люциферазы, который катализирует замещение пирофосфата (PP) в АТФ карбоксильной группой люциферина (L) с образованием люциферил-АМФ и обратное замещение люциферина в люциферил-АМФ пирофосфатом с образованием АТФ и люциферина [схема (7)].

В отсутствие пирофосфатсодержащих соединений связанный на ферменте люциферил-АМФ совершенно стабилен, однако в присутствии пирофосфата или АТФ он становится реакционноспособным и реагирует с образованием АТФ в присутствии пирофосфата или претерпевает гидролиз в присутствии АТФ [26]. Таким образом, в присутствии АТФ наблюдается АТФ-азная активность, причиной которой может быть активация субстрата к атаке водой этим пирофосфатсодержащим соединением (АТФ). В соответствии с гипотезой напряжения присутствие пирофосфатсодержащей группы индуцирует напряжение в комплексе люциферил-АМФ-фермент, облегчая реак-

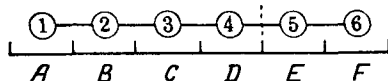
цию с подходящим акцептором. Аналогичная интерпретация возможна для



гидролиза валил-АМФ под действием изолейцил-РНК-синтетазы, которая активируется в присутствии транспортной РНК, содержащей изолейцин-специфические цепи [27].

6. ЛИЗОЦИМ

Рентгеноструктурное изучение лизоцима и комплексов лизоцима с ингибиторами [28] позволило существенно конкретизировать и сделать более реальными рассуждения, изложенные выше. Лизоцим катализирует расщепление N-ацетилмурамидных связей в чередующемся сополимере N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамовая кислота, содержащемся в стенках клеток бактерий, а также расщепляет олигосахариды с той же чередующейся структурой и даже полимеры, содержащие только N-ацетилглюкозамин. Рентгеноструктурное изучение показало, что область, связывающая субстрат на ферменте, представляет собой щель, которая может взаимодействовать с шестью гексозными остатками; их центры обозначены буквами А — F (XII)



XII

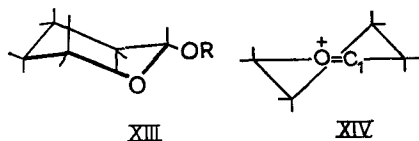
Гексасахарид N-ацетилглюкозамина расщепляется между остатками 4 и 5; фермент катализирует расщепление у углеродного атома C-1 гексозной группы, связанной с центром D.

Измерения констант диссоциации и констант Михаэлиса N-ацетилглюкозаминных олигосахаридов показывают, что в данном случае происходит увеличение энергии связывания при росте числа гексозных остатков от одного до трех, но при дальнейшем росте цепи заметного улучшения связывания не наблюдается [29]. Тем не менее дальнейший рост длины цепи приводит к резкому увеличению скорости расщепления; так, гексамер реагирует более чем в 30 000 раз быстрее, чем мономер, несмотря на то, что они имеют почти одинаковые константы связывания [30]. Этого следовало ожидать, если допустить наличие непродуктивного связывания, что согласуется и с рентгеноструктурной моделью: короткие олигосахариды преимущественно связываются с центрами А — С, которые непродуктивны. Связывание субстратов с более длинной цепью происходит с участием центров D и E, что и обеспечивает протекание реакции. Отсутствие увеличения общей энергии связывания при росте длины цепи показывает, что взаимодействие с центрами D и E происходит с очень небольшой энергией связывания. Как видно из уравнений (4) и (5), наблюдаемая максимальная скорость для коротких субстратов определяется высокой константой скорости реакции очень небольшой доли

субстрата, связанного продуктивно центрами D и E, а наблюдаемая константа связывания представляет собой в основном сумму констант связывания с непродуктивными центрами с незначительным вкладом за счет слабого связывания с продуктивными центрами.

Затруднения, возникающие при продуктивном связывании субстрата с активным центром, наиболее четко были продемонстрированы измерением констант связывания для олигосахаридов с чередующейся N-ацетилглюкозамин (G) — N-ацетилмуравовая кислота (M)-структурой [31]. Для этих субстратов наблюдается увеличение энергии связывания с ростом длины цепи (как и в случае полимеров N-ацетилглюкозамина) вплоть до трех гексозных остатков, однако добавление четвертого остатка M с образованием структуры G-M-G-M приводит к *уменьшению* энергии связывания на 2,9 ккал/моль ($12,2 \cdot 10^3$ Дж/моль). Эта неблагоприятная энергия связывания с D-центром означает, что недеформированный остаток гексозы некомплементарен этому центру, так что связывание в этом положении происходит в том случае, если остаток M вводится в этот центр за счет энергии связывания соседних гексозных остатков.

Эти факты становятся понятными при изучении кристаллографической структуры молекулы фермента и химии катализируемой реакции. Как было описано в гл. 3, разд. Д.3, расщепление у C-1 атома углерода гексозы, связанной с центром D, протекает, по всей вероятности, при участии карбоксилатного иона и карбоксильной группы активного центра фермента через переходное состояние, которое имеет некоторое сходство со структурой иона карбония. Существование реакций переноса на специфические акцепторы с сохранением конфигурации C-1 атома углерода показывает, что распад этого переходного состояния ведет к образованию промежуточного соединения аналогичной структуры с временем жизни, достаточным для того, чтобы уходящая группа могла диффундировать с центра E и заместиться молекулой акцептора [30, 32]. Образование похожего на ион карбония переходного состояния требует искажения гексозного кольца из конформации кресла (XIII) в конформацию полукресла (XIV) с тем, чтобы произошла резонансная стабилизация при взаимодействии положительного заряда атома углерода и соседнего атома кислорода. Данные рентгеноструктурного анализа и результаты, описанные выше, показывают, что фермент снижает энергию, необходимую для достижения переходного состояния, путем принудительного перевода гексозного кольца на центре D в конформацию полукресла. Этот процесс представляет собой превращение энергии связывания в энергию напряжения или деформации, понижающее энергию активации.

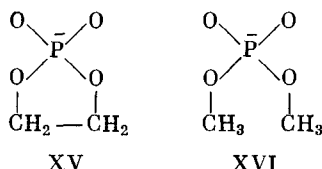


Отсюда следует, что активный центр связывает переходное состояние в конформации полукресла лучше, чем субстрат.

На вероятность того, что напряжение может изменять реакционную способность групп в ферментах, особенно реакционную способность комплексов с металлами, указал Виллиамс [33]. Эффективная основность, кислотность или окислительно-восстановительный потенциал реагирующих групп могут изменяться вследствие стерических особенностей белка, увеличивая реакционную способность этих групп, и необычные спектры многих металлопротеинов, по-видимому, свидетельствуют о существовании таких изменений.

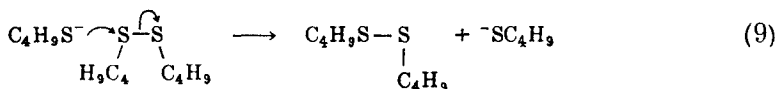
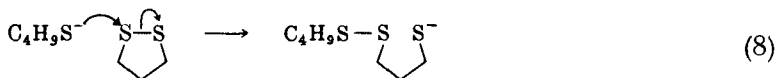
7. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

Существует много примеров химических реакций, в которых напряжение способствует увеличению скорости, и в некоторых из них это увеличение близко по величине к ферментативным ускорениям. Одним из наиболее ярких примеров подобного влияния является щелочной гидролиз этиленфосфата (XV) при сравнении его с гидролизом структурно родственного соединения диметилфосфата (XVI) [34—36].



Гидролиз циклического соединения с расщеплением связи Р — О происходит по крайней мере в 10^8 раз быстрее, чем реакция нециклического соединения. Это различие в скоростях является следствием напряжения и дестабилизации, вызываемых циклической структурой соединения (XV), что приближает его частично к структуре переходного состояния. Интересно отметить, что, хотя напряжение должно снижаться в переходном состоянии, это, однако, не определяет природу продукта реакции, поскольку гидролиз пятичленного циклического триэфира при нейтральных значениях pH дает в качестве продуктов как циклический эфир, так и диэфир с открытой цепью. Это значит, что напряжение, вносимое пятичленным кольцом, не представляет собой простого отталкивания атомов в кольце, которое облегчало бы раскрытие кольца. Быстрый, катализируемый кислотой обмен меченых атомов кислорода воды с атомами этиленфосфата без раскрытия кольца является другим выражением того же явления [35]. Если фермент мог бы индуцировать аналогичную специфическую дестабилизацию фосфорного эфира или другого субстрата относительно переходного состояния реакции, это служило бы объяснением значительной доли эффекта увеличения скорости, вызываемого ферментами.

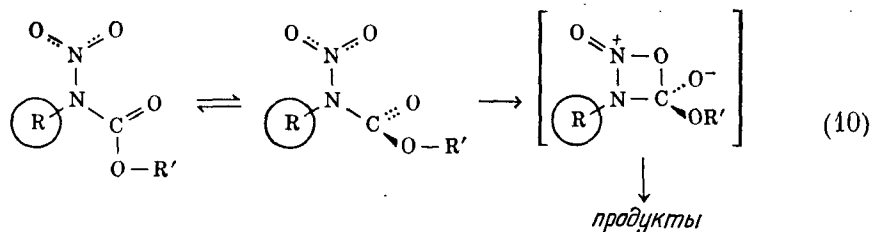
В качестве другого примера увеличения скорости приблизительно в 10^4 раз можно рассмотреть реакцию замещения тиоловой группы в напряженном триметилendisulфидном кольце [схема (8)] по сравнению с соответствующей реакцией дисулфида с открытой цепью [схема (9)].



Интересно предположение, что большое увеличение скорости в этой реакции, по-видимому, отражает более предпочтительную энтропию активации реакции циклического соединения, хотя это мнение нельзя считать окончательным [38].

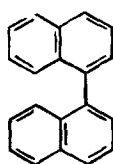
К несколько другому типу стерических ускорений могут приводить громоздкие группы, которые принуждают реагирующие группы принять реакционноспособную конформацию. Так, разложение *трет*-бутил-N-нитрокарбамата протекает в 10^8 раз быстрее, чем в случае *н*-бутильного соединения. Громоздкая *трет*-бутильная группа дестабилизирует исходное состоя-

ние, приводя во взаимодействие нитро- и карбометокси-группы [схема (10)].

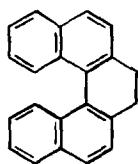


Уменьшение этой дестабилизации в переходном состоянии ведет к увеличению скорости, которое полностью проявляется в уменьшении *энергии* активации на 5,4 ккал/моль ($22,7 \cdot 10^3$ Дж/моль) [39]. Четкой грани между этим типом увеличения скорости и увеличением скорости, вызываемым эффектом сближения, как описано в гл. 1, не существует.

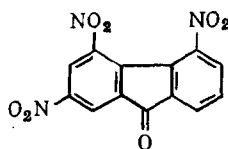
Значительно меньше имеется примеров неферментативных реакций в растворе, в которых скорость реакции возрастает за счет индуцирования напряжения в субстрате при связывании с катализатором. Катализ рацемизации оптически активных молекул 1,1'-бинафтила (XVII) и 9,10-дигидро-3,4;5,6-добензофенантрена (XVIII) тринитрофлуороном (XIX) представляет собой простой и четкий пример такого типа ускорений, хотя максимально наблюдается лишь двукратное увеличение скорости [40]. Образование комплекса между асимметрическим субстратом и плоским катализатором облегчает образование планарного переходного состояния, которое требуется для реакции рацемизации.



XVII

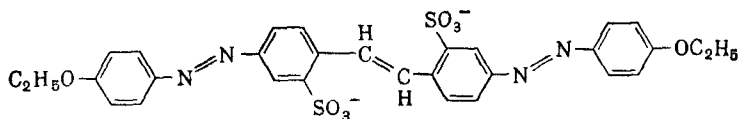


XVIII



XIX

Более сложный пример, который, возможно, представляет аналогичный тип катализа, — это реакция *цис-транс*-изомеризации растворимого в воде азокрасителя хризофенина (XX) под действием некоторых белков [41].



XX

Скорость изомеризации возрастает в 30—80 раз в присутствии сывороточного альбумина и β -лактоглобулина. Величину этих ускорений нельзя объяснить простыми сольватационными эффектами, и, кроме того, малые молекулы, которые соответствуют функциональным группам боковых цепей белка, не обладают заметной каталитической активностью. Катализируемая реакция обнаруживает максимум скорости в области pH, в которой, как было отмечено, белки претерпевают конформационные изменения. Это указывает на то, что при адсорбции красителя могут происходить конформационные изменения, приводящие к индуцированию напряжения и увеличению реакционной способности связанного красителя.

Весьма вероятно, что индуцирование напряжения существенно в гетерогенном катализе и в реакциях, включающих твердые тела и полимеры. Так, в системе кристаллы триоксана — пары формальдегида происходит полимеризация с образованием полиоксиметиленового полимера, в котором цепи выстраиваются параллельно оси симметрии шестого порядка исходного кристалла, однако никакой реакции не наблюдается с тетроксаном [42]. Поскольку тетроксан с его напряженным восьмичленным циклом должен обладать большей реакционной способностью, чем триоксан, очевидно, кристаллическая структура сообщает последнему соединению повышенную реакционную способность и определяет структуру продукта. Механическая деформация полимеров вызывает напряжения и разрывы химических связей, что приводит к увеличению реакционной способности. Так, растяжение резины приводит к увеличению скорости реакции с озоном, который, вероятно, реагирует со связями, претерпевающими напряжение или полностью расщепляющимися с образованием свободных радикалов при механической деформации.

Г. СКОРОСТИ КОНФОРМАЦИОННОГО ИЗМЕНЕНИЯ

Изменение конформации фермента является существенной особенностью механизма индуцированного соответствия и может происходить также в деформационном механизме, поэтому возникает вопрос, каковы временные соотношения между такими конформационными изменениями и самим каталитическим процессом. Очевидно, небольшие изменения в положении аминокислотных остатков вблизи активного центра фермента могут происходить очень быстро, кроме того, известно, что переход спираль — клубок большой молекулы полиглутаминовой кислоты также протекает с высокой скоростью [44, 45]. С другой стороны, большинство структурных изменений белков, которые можно обнаружить физическими методами, в большинстве случаев протекает за время от нескольких секунд до нескольких часов, по-видимому, вследствие того, что скорость определяющей стадии (которая сама по себе быстра) предшествуют неблагоприятные равновесные стадии. Такие относительно медленные конформационные изменения не могут происходить в каждом каталитическом обороте фермента, однако могут иметь значение для осуществления контроля ферментативной активности, как и в случае механизма индуцированного соответствия.

Несмотря на то что обычными физическими измерениями трудно обнаружить небольшие конформационные изменения, однако в некоторых случаях были найдены свидетельства, указывающие на то, что такие конформационные изменения индуцируются субстратами. Совершенно очевидно, что взаимодействие двух конформационно подвижных молекул в растворе должно приводить к обратимым конформационным изменениям в этих молекулах, и было бы весьма удивительно, если бы этого не происходило. Поэтому в настоящее время главным вопросом является не доказательство существования таких конформационных изменений, а выяснение их природы, скоростей, с которыми они происходят, и выявление роли, которую они играют в ферментативном катализе.

Простой и непосредственный метод обнаружения субстрат-зависимых конформационных изменений заключается в демонстрации того, что субстрат вызывает увеличение *скорости* реакции белка с добавленным соединением, таким, как сульфгидрильный реагент или протеолитический фермент, которое нельзя приписать электростатическому эффекту. Другое простое средство, которым часто пренебрегают, основано на том, что вследствие малой скорости многих конформационных изменений следует ожидать, что зависящая от субстрата активация фермента потребует заметного периода времени, т. е. при достижении максимальной активности наблюдается период

индукции. Трудно объяснить этот период индукции каким-либо другим механизмом, помимо изменения конформации фермента или химической реакцией с ферментом, которые протекают с константой скорости, меньшей, чем константа скорости, характеризующая число оборотов фермента. Существование таких медленных конформационных изменений приводит к серьезным сложностям при изучении ферментативной кинетики методами быстрого смешивания, поскольку состояние фермента в отсутствие субстрата может отличаться от состояния фермента в его присутствии и взаимное превращение этих форм фермента может быть сравнительно медленным по сравнению с максимальной скоростью превращения субстрата.

Пример активации субстратом, которая зависит как от времени, так и от температуры, был найден Финчем при изучении дегидрогеназы мутанта *Neurospora* [46]. Период индукции был обнаружен при восстановлении пирувата НАДН₂, катализируемом D-лактатдегидрогеназой из *Escherichia coli*. Этот период индукции, который является следствием медленного конформационного изменения, исчезает в результате предварительной инкубации фермента с пируватом. Период индукции не может быть связан с изменением ассоциации субъединиц фермента, поскольку скорость изменения ферментативной активности не зависит от концентрации фермента и молекулярный вес фермента в очень разбавленных растворах не меняется в присутствии пирувата [47]. Существуют и другие примеры медленных, зависящих от концентрации субстрата изменений в ферментативной активности [48].

В последнее время появилась возможность изучать физические свойства белков такими методами, как температурный скачок, которые позволяют исследовать процессы с временами, соизмеримыми с временами каталитического превращения субстрата на ферменте, так что стало возможным непосредственно установить взаимосвязь между скоростями субстратзависимых конформационных изменений и скоростями самой реакции. В настоящее время имеется уже несколько свидетельств в пользу существования изомеризации ферментов и ферментсубстратных комплексов, которые могут представлять собой конформационные изменения такого рода [49—52]. Скорость мономолекулярной изомеризации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы характеризуется константой порядка 1 с^{-1} и является слишком медленной, чтобы этот процесс имел место при каждом обороте фермента; по-видимому, этот процесс относится к явлениям контроля ферментативной активности. Рентгеноструктурный анализ лизоцима [28], химотрипсина [54] и карбоксипептидазы [55] дал прямое доказательство существования изменений в конформации фермента при взаимодействии с субстратами или ингибиторами. Гемоглобин, хотя и не является ферментом, но может быть поучительным примером использования всех этих методов для демонстрации конформационных изменений при взаимодействии этого белка с кислородом [56].

Во многих случаях конформационные изменения белков связаны с ассоциацией или диссоциацией субъединиц. Маловероятно, что такие процессы могут протекать достаточно быстро, чтобы они были существенны при каждом превращении молекулы субстрата, так что их роль, по-видимому, сводится к контролю ферментативной активности. На вопрос, связаны ли все эти процессы с изменением конформации отдельных субъединиц, до настоящего времени не было найдено определенного ответа, однако весьма вероятно, что в большинстве случаев такие изменения имеют место, и было бы весьма удивительно, если бы столь большие структурные перестройки происходили бы без соответствующего конформационного изменения субъединиц. В случае щелочной фосфатазы из *E. coli* было показано, что зависящее от времени конформационное изменение кислотно диссоциирующих субъединиц должно иметь место до того, как частицы ассоциируются в нативный фермент [57].

Не исключено, что конформационные изменения могут быть частично или полностью лимитирующей стадией катализируемой реакции [49]. Это должно иметь особое значение, если скорость этих изменений одинакова для различных субстратов [56], так как одинаковые скорости реакций структурно различных субстратов обычно трактуют как свидетельство существования общего ковалентного фермент-субстратного промежуточного соединения, как, например, в случае серии различных эфиров с той же ацильной группой, гидролизруемых химотрипсином или папаином (гл. 2, разд. 5,2).

Если конформационное изменение и разрушение связи происходят синхронно [уравнение (11)], то маловероятно, что будут наблюдаться одинаковые скорости, поскольку энергетический барьер в этом случае должен представлять сумму барьеров двух этих процессов:



Так как второй барьер должен быть различным для различных субстратов, наблюдаемые скорости реакции также должны различаться. Однако если субстрат связывается только с формой E и превращение в форму E' является необходимой стадией, предшествующей расщеплению связи [схема (12)], то образование и разрушение ковалентных связей не обязательно будет происходить на скорость определяющей стадии.



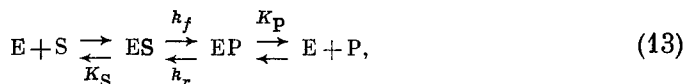
Если конформационное изменение индуцируется силами связывания субстрата, как в механизмах индуцированного соответствия или деформационном, индуцирующие силы не могут быть одинаковыми для различных субстратов, и маловероятно, однако не невозможно, что для различных субстратов будут наблюдаться одинаковые скорости. Если конформационные изменения являются спонтанными и происходят в присутствии и в отсутствие субстрата, они не могут вызвать индуцирования напряжения, но могут привести к изменению каталитически активной конформации фермента. Такое изменение может произойти со скоростью, которая не зависит от природы субстрата. В связи с этим интересно отметить, что максимальные константы скорости для реакции родственных субстратов, которые, как полагают, имеют общее ковалентное промежуточное соединение, часто точно не эквивалентны. Такие малые различия, которые, по-видимому, превышают экспериментальные ошибки определения констант скоростей, наблюдаются, например, для папаина и ацетилхолинэстеразы [59]. Причиной этого может быть либо то, что разложение общего ковалентного промежуточного соединения не является полностью лимитирующей стадией, так как скорость его образования вносит известный вклад в наблюдаемую максимальную скорость реакции, или то, что скорость определяющей стадией является конформационное изменение, а не разложение промежуточного соединения.

Д. ОБРАТИМОСТЬ

Нельзя не учитывать того обстоятельства, что фермент катализирует реакцию в обоих направлениях и что некоторые механизмы, такие, как простое растяжение субстрата, могут объяснить катализ реакции только в одном направлении. Чтобы механизмы деформации и напряжения могли объяснить ускорение реакции в обоих направлениях, необходимо, чтобы в результате деформационных взаимодействий как исходные вещества, так и продукты реакции приближались к переходному состоянию. Это значит,

например, что для нуклеофильных реакций, реакций гидролиза сложных эфиров и других ацилсоединений будет наблюдаться вынужденный переход карбонильного атома, имеющего sp^2 -гибридизацию, к тетраэдрической структуре, близкой к sp^3 и характерной для переходного состояния.

Соотношение между кинетическими параметрами ферментативной реакции уравнения (13) в прямом и обратном направлениях дается уравнением Хелдена [уравнение (14)], в котором K_S и K_P — константы диссоциации комплексов фермент-субстрат и фермент-продукт соответственно.

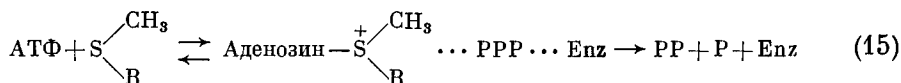


$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} = \frac{1}{K_S} \frac{k_f}{k_r} K_P. \quad (14)$$

Существует ряд примеров, свидетельствующих как будто о том, что ферменты катализируют реакцию более эффективно в одном направлении, чем в другом. Однако это никоим образом не противоречит принципу микроскопической обратимости, поскольку условия, в которых проводили измерения, различаются для двух направлений реакции; в условиях равновесия фермент должен осуществлять равный катализ в обоих направлениях. Чтобы удовлетворять соотношению Хелдена, отношение констант скоростей k_f/k_r , которое отлично от K_{eq} , должно согласовываться с величинами K_S и K_P . Так, если катализ реакции в прямом направлении много больше, чем в обратном (в условиях, в которых фермент насыщен субстратом или продуктом при измерении начальных скоростей реакции в каждом направлении), константа диссоциации K_S должна быть больше, чем K_P . Такие малые значения K_P часто приводят к сильному ингибированию продуктом реакции в прямом направлении.

В согласии с моделями напряжения и индуцированного соответствия использование сил связывания вызывает увеличение максимальной скорости реакции. Согласно этим моделям, можно объяснить катализ одного направления реакции, если превращение энергии связывания в энергию напряжения или ориентацию каталитических групп будет более важным в прямом направлении реакции, чем в обратном, так что K_S и k_f будут больше, чем K_P и k_r . Такое поведение особенно вероятно в рамках деформационной модели, если активный центр соответствует субстрату или продукту больше, чем переходному состоянию. Например, если активный центр комплементарен продукту реакции, то это будет приводить к использованию энергии связывания для увеличения скорости реакции субстрата путем перевода его в структуру, соответствующую продукту реакции, однако продукт будет хорошо связываться без увеличения скорости реакции в обратном направлении.

Пример «однонаправленного» катализа был найден в реакции метионин-активирующего фермента, первая стадия которой [схема (15)] представляет собой почти необратимый процесс



В этом случае соотношение Хелдена удовлетворяется благодаря очень сильному связыванию продукта — неорганического трифосфата, — который, по оценкам, имеет энергию связывания, превышающую —9,4 ккал/моль (—38,5 · 10³ Дж/моль). Аналогичная энергия связывания должна была бы реализоваться при связывании трифосфатной группы АТФ, и большую скорость реакции в прямом направлении частично можно объяснить превращением энергии связывания в энергию напряжения. Значительная величина

этой энергии связывания является выражением того, что, хотя индивидуальные силы связывания слабы, сумма связывающих сил между ферментом и субстратом часто достаточно велика, чтобы вызвать существенное увеличение скорости при превращении в энергию напряжения.

Е. ЭНТРОПИЯ, ЭНТАЛЬПИЯ И СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ

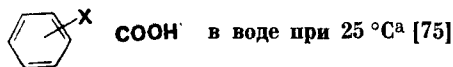
Из теоретических соображений следовало бы ожидать, что индуцирование напряжения при изгибании или растягивании связей или при сжатии атомов должно приводить к изменению теплоты активации реакции. Достижение соответствующей взаимной ориентации фермента и субстрата, что характерно для гипотез непродуктивного связывания и индуцированного соответствия, подразумевает достижение минимальной разупорядоченности и должно приводить к изменениям энтропии активации. Однако существует несколько причин, по которым трудно или невозможно провести четкую грань между этими механизмами при исследовании энтропий и энтальпий активации реакций. Это положение заслуживает обсуждения, поскольку существует распространенное мнение, что измерение теплоты реакции или теплоты активации дает более фундаментальное проникновение в механизм реакции и особенно в природу эффектов заместителей, чем измерение соответствующих свободноэнергетических параметров.

Для интерпретации полярных влияний заместителей, стерических и резонансных эффектов, роли деформаций и родственных эффектов необходимо знать влияние этих факторов на потенциальные энергии реагирующих веществ, различных возможных переходных состояний и продуктов реакции. Первая трудность заключается в том, что экспериментально определяемая теплота реакции или теплота активации не является прямой мерой искомой потенциальной энергии, поскольку она содержит члены, включающие функции распределения и будет существенно отличаться от потенциальной энергии при любой температуре выше абсолютного нуля, при которой существенны колебательная и вращательная энергии. Фактически измеренные значения ΔH и $\Delta H^\ddagger$ — не лучшая, а может быть, даже и худшая, мера искомых разностей потенциальной энергии по сравнению с ΔF и $\Delta F^\ddagger$, которые непосредственно экспериментально определяются из константы равновесия или константы скорости [61].

Вторая трудность, которая особенно существенна для реакций в водных растворах, заключается в том, что наблюдаемые термодинамические величины сильно искажены за счет сольватационных эффектов и необходимо вводить поправки на эти эффекты, прежде чем делать заключения о внутренних энергиях реакции. Так, можно ожидать, что индуктивные и резонансные эффекты заместителей при ионизации фенолов и карбоновых кислот будут проявляться в энергиях кислоты и аниона, однако различие в кислотностях этих соединений определяется в большей степени энтропиями, а не теплотами ионизации [62]. Это видно из данных для замещенных бензойных кислот, приведенных в табл. 2. То же явление наблюдается для констант скоростей реакций производных фенола: различие в скоростях щелочного гидролиза замещенных фенилацетатов в воде вызывается только различиями в энтропии активации [63]. Влияние растворителя на величины термодинамических параметров активации видно из того факта, что в смешанном растворителе ацетон (60%) — вода различие в скоростях гидролиза тех же эфиров почти полностью определяется различием в энтальпии активации [64]. Одна из причин влияния полярных свойств заместителей на энтропию реакции заключается в том, что диэлектрическая проницаемость, которая определяет передачу электростатического влияния от заместителя на реакционный центр, зависит от температуры и эта зависимость проявляется в энтропии реакции.

Таблица 2

Ионизация замещенных бензойных кислот



X	pK	ΔF°	ΔH°	$T\Delta S^{\circ}$
<i>n</i> -OH	4,582	-0,24	0,65	0,89
H	4,213	-0,75	0,53	1,28
<i>n</i> -Br	4,002	-1,03	0,22	1,25
<i>n</i> -Cl	3,986	-1,06	0,34	1,40
<i>m</i> -Cl	3,827	-1,27	-0,07	1,20
<i>m</i> -Br	3,809	-1,30	0,05	1,35
<i>m</i> -CN	3,598	-1,58	0,07	1,65
<i>n</i> -CN	3,551	-1,65	0,14	1,79
<i>n</i> -NO ₂	3,442	-1,80	0,14	1,94

^a Briegleb G., Bieber A., Z. Elektrochem., 55, 250 (1951).

Этот своеобразный механизм влияния растворителя объясняет большую часть эффектов заместителей в термодинамике ионизации замещенных бензойных кислот [65].

В качестве примера обсудим тот факт, что *n*-нитрофенол как кислота в 15 раз сильнее, чем *m*-нитрофенол, хотя теплоты ионизации одинаковы; различие проявляется полностью в энтропиях реакции. Это становится понятным, если наряду с внутренними энергиями рассмотреть энергии сольватации, как это делает Хеплер [66]. Наблюдаемое различие в свободных энергиях ионизации $\Delta\Delta F_{\text{obs}}$ складывается из разностей в энтальпии и энтропии кислот и анионов ($\Delta\Delta H_{\text{int}}$, $\Delta\Delta S_{\text{int}}$) и соответствующих разностей, возникающих в результате взаимодействия реагирующих веществ и продуктов реакции с растворителем ($\Delta\Delta H_{\text{solv}}$, $\Delta\Delta S_{\text{solv}}$) [уравнение (16)]:

$$\Delta\Delta F_{\text{obs}} = \Delta\Delta H_{\text{int}} - T\Delta\Delta S_{\text{int}} + \Delta\Delta H_{\text{solv}} - T\Delta\Delta S_{\text{solv}}. \quad (16)$$

При сравнении членов серии структурнородственных соединений различие во внутренней энтропии ионизации $\Delta\Delta S_{\text{int}}$ мало, и им обычно можно пренебречь, поскольку в пределах одной реакционной серии изменение в упорядоченности реагентов и продуктов реакции постоянно [66, 67], откуда следует уравнение

$$\Delta\Delta F_{\text{obs}} = \Delta\Delta H_{\text{int}} + \Delta\Delta H_{\text{solv}} - T\Delta\Delta S_{\text{solv}}. \quad (17)$$

Далее можно ожидать, что сольватационные члены $\Delta\Delta H_{\text{solv}}$ и $\Delta\Delta S_{\text{solv}}$ меняются таким образом, что они частично или полностью будут взаимно компенсироваться при температурах большинства экспериментальных измерений. Это следует как из теории растворов, так и из экспериментальных измерений большого числа различных систем. Так, в случае замещенных нитрофенолов причина того, что *пара*-изомер более кислотен, заключается, по-видимому, в большей резонансной стабилизации аниона *n*-, чем *m*-нитро-группой. Поэтому плотность заряда на фенольном атоме кислорода аниона будет больше для *мета*-замещенного соединения. Эта более высокая плотность заряда будет приводить к более сильному взаимодействию с сольватирующими молекулами воды по сравнению с *пара*-изомером (более отрицательное значение ΔH_{solv}), однако это более сильное взаимодействие также

будет приводить и к более высокой степени ориентации молекул воды вокруг отрицательного заряда (более отрицательное ΔS_{soln}), которая будет иметь тенденцию компенсировать изменение энтальпийного члена. Этот тип компенсации, по-видимому, является распространенным явлением; энтальпии и энтропии сольватации могут обнаруживать очень большие изменения, однако это приводит к очень небольшим изменениям свободной энергии сольватации. В случае если это уравнивание полное (а оно, по-видимому, почти полное в процессах ионизации при обычных температурах), приходим к выводу, что наблюдаемые разности свободных энергий являются достаточно хорошей мерой разностей внутренней энтальпии реакции [уравнение (18)]

$$\Delta\Delta F_{\text{obs}} = \Delta\Delta H_{\text{int}}. \quad (18)$$

Этот вывод находится в согласии с тем, что подсказывает химическая интуиция, и, кроме того, с различными теоретическими приближениями для большого числа реакционных серий, в которых эффекты заместителей лучше коррелируют с наблюдаемыми свободными энергиями (т. е. с $\log K$ или $\log k$), чем с энтальпиями реакций [68, 69]. Таким образом, определения энтальпии и особенно энтропии реакции весьма полезны для установления различий в сольватации реагирующих веществ, переходного состояния и продуктов реакции, однако они не обеспечивают удобного критерия для обнаружения различий во внутренней структуре и стабилизации или в потенциальной энергии этих частиц.

Следует ожидать, что для перенесения молекулы субстрата из разбавленного раствора в активный центр фермента и перевода их в положение, которое отражает переходное состояние реакции, необходимы изменения как в энтальпии, так и в энтропии. Эти изменения трудно разделить даже теоретически, поскольку достижение продуктивного связывания с соответствующей ориентацией и упорядочением как фермента, так и субстрата почти наверное будет включать изгибание и деформацию связей и атомных групп, т. е. изменения в энтальпии, и маловероятно, что эти процессы могут иметь место без сопровождающего энтропийного вклада, связанного с ограничением движения молекул. Таким образом, можно с одинаковым правом говорить как о «энтропийном напряжении», так и о «энтальпийном напряжении», однако так же как и в случае анализа эффектов сближения (гл. 1), ясное различие между этими эффектами трудно получить только на основе экспериментально определяемых термодинамических величин.

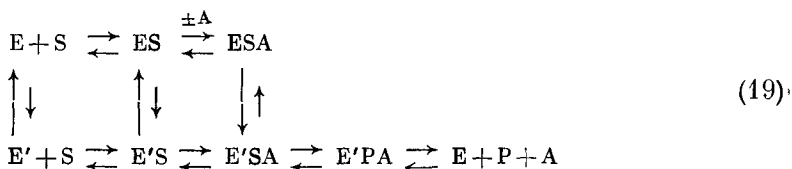
Ж. ОСЦИЛЛИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Предположим, что фермент может существовать в двух состояниях: в состоянии E' , в котором он индуцирует напряжение в субстрате, облегчая превращение его в продукт, и в состоянии E , в котором он индуцирует напряжение в продукте, превращая его обратно в субстрат. Такого рода система схематически приведена на рис. 7. Если бы существовал механизм с соответствующей движущей силой, по которому формы E и E' претерпевали бы взаимное циклическое превращение, фермент мог бы катализировать реакции в обоих направлениях. Для системы, приведенной на рис. 7, реакция включала бы разрыв субстрата и сталкивание продуктов. Такого рода механизм не имел бы ограничения механизмов, рассмотренных выше, которое заключается в том, что фермент должен воздействовать как на субстрат, так и на продукты реакции, переводя их в состояние, похожее на переходное состояние, *одинаковое* для обоих направлений; по осциллирующему механизму субстрат может быть переведен в переходное состояние, которое соответствует *продукту* реакции, и продукты — в переходное состояние, которое соответствует *субстрату*. Серьезное теоретическое возражение

против такого механизма заключается в том, что он противоречит принципу микроскопической обратимости, поскольку прямая и обратная реакции в этом механизме протекают разными путями.

Другая серьезная проблема, возникающая при обсуждении механизма осциллирующего фермента, — это вопрос об источнике энергий, которая заставила бы фермент осциллировать между двумя конформациями с удовлетворительной движущей силой, обеспечивающей перемещение субстрата и протекание реакции. Трудно представить себе колебания молекулы белка, подобные колебаниям пружины, которые использовали бы тепловую энергию и которые бы не затухали под действием случайных внутренних колебаний и встреч с молекулами растворителя. Такие колебания требовали бы специального механизма для фокусирования или координации тепловой энергии кооперативным способом, что до настоящего времени не было четко исследовано*. Можно предположить, что силы связывания субстрата могут быть использованы для перевода фермента в конформацию E' и силы связывания продукта — для перевода его в конформацию E , но обычно различия в структуре субстрата и продукта недостаточны, чтобы обеспечить движущую силу для двух таких различных изменений.

Механизм, по которому, по-видимому, можно осуществить катализ реакции в одном направлении по механизму осцилляций, включает связывание активатора A с комплексом ES , которое облегчает реакцию индуцированием конформационного изменения с образованием $E'SA$ [схема (19)].

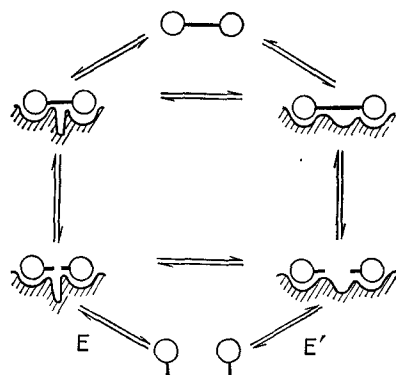


В этом механизме движущей силой такого конформационного изменения является энергия связывания молекулы активатора. Необходимо, чтобы активатор связывался только с комплексом ES по принудительному, упорядоченному механизму. В данном случае не наблюдается противоречия с принципом микроскопической обратимости, однако эффективный катализ реакции в обратном направлении по механизму осцилляций требовал бы другого активатора, который должен индуцировать другое конформационное изменение.

3. МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ И АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ [70]

Детальное обсуждение роли конформационных изменений в механизмах регулирования ферментативной активности выходит за рамки данной монографии, и здесь будут рассмотрены только некоторые аспекты этой проблемы.

* Есть все основания полагать, что такой механизм будет противоречить второму началу термодинамики. — *Прим. ред.*



Р и с. 7. Катализ расщепления и образования связи осциллирующим ферментом [1].

Ферменты часто проявляют ингибирующее или активирующее влияние в присутствии физиологических концентраций метаболитов, которые являются предшественниками или продуктами метаболического пути, включающего данный фермент. Регулирование ферментативной активности по такому механизму обеспечивает поддержание концентраций метаболитов на физиологическом уровне. Такой контроль ферментативной активности может осуществляться изменениями конформации фермента, вызываемыми активаторами, ингибиторами или субстратами, и часто включает взаимодействия между субъединицами фермента. Особенно важными аспектами этой проблемы являются: 1) кооперативная природа таких взаимодействий и 2) контроль ферментативной активности посредством связывания молекулы с центром, отличающимся от активного центра. Изменения ферментативной активности, которые попадают в эту категорию, часто называют «аллостерическими» эффектами, однако использование этого термина, к сожалению, не ограничивается этим единственным смыслом.

Кооперативные взаимодействия часто проявляются в хорошо известных сигмоидальных кривых, связывающих ферментативную активность с концентрацией субстрата или активатора. Начало такой кривой имеет вогнутость, и это значит, что скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата или активатора в степени, большей чем первая, т. е. для обеспечения максимальной активности с ферментом должны связаться две или большее число молекул. Это означает также, что связывание с отдельными центрами дает больше, чем простой аддитивный эффект, и указывает на то, что должно происходить некоторое взаимодействие связывающих центров между собой.

Различные связывающие центры обычно расположены на разных субъединицах фермента, так что это взаимодействие отражает взаимодействие субъединиц. Это взаимодействие может приводить к изменениям либо в максимальной скорости, либо в связывании субстрата с ферментом, либо в том и в другом, и не всегда из кинетики реакции очевидно, какое изменение происходит. Были предложены различной сложности математические модели, объясняющие этот тип кинетического поведения [71, 72]. Однако число переменных в этих моделях так велико, что трудно или даже невозможно сделать между ними выбор из кинетики данной реакции, и механизм этих эффектов может быть более успешно понят путем изучения физических или химических свойств системы. Так, изучение физических свойств аспартаттранскарбамилазы показало, что фермент состоит из двух каталитически активных субъединиц, которые можно отделить от четырех меньших размером ингибиторных субъединиц. Ингибиторные субъединицы могут связывать молекулы ингибитора даже после того, как они отделены от каталитических субъединиц [73].

Фермент ксантозин-5'-фосфатаминаза иллюстрирует некоторые стороны механизма регуляции, которые могут отражать связывание на центре, отличным от активного центра. Этот фермент подвергается неконкурентному ингибированию антибиотиком псикофуранином, который структурно связан с регуляторными метаболитами этой системы. Так же как в случае многих ферментов подобного рода, ингибиторная активность может быть утрачена при добавлении веществ, которые, как можно ожидать, изменяют структуру белка, например мочевины или сульфгидрильных реагентов, или при фотоокислении в присутствии красителя метиленового голубого. Это происходит без нарушения каталитической активности фермента и указывает, что центр ингибирования отличается от каталитического центра. Взаимодействие фермента с меркаптоэтанолом приводит к частичному понижению чувствительности к ингибированию, хотя фермент продолжает связывать ингибитор. Это является дальнейшим подтверждением того, что в интактном белке существует область между каталитическим и регуляторным центрами, через

которую передается регуляторный эффект. Исследование седиментации фермента в градиенте сахарозы показало, что для этих изменений диссоциация субъединиц не играет заметной роли [74].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lumry R., in Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (eds.), «The Enzymes», 2d ed., vol. 1, Academic Press Inc., New York, 1959, p. 157; Linderstrom-Lang K. U., Schellman J. A., ibid., pp. 443, 466; Hammes G. G., Nature, 204, 342 (1964); Wilson I. B. in Florkin M., Stotz E. H. (eds.), «Comprehensive Biochemistry», vol. 12, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964, p. 285; Jencks W. P. in Kaplan N. O., Kennedy E. P. (eds.), «Current Aspects of Biochemical Energetics», Academic Press Inc., New York, 1966, p. 273; Lumry R., Biltonen R., in Timasheff S., Fasman G. D. (eds.), «Biological Macromolecules», vol. 2, chap. 1, Marcel Dekker, Inc., New York, 1969.
2. Joshi J. G., Handler P., J. Biol. Chem., 235, 2981 (1960).
3. Greene R. C., Davis N. B., Biochim. Biophys. Acta, 43, 360 (1960).
4. Buchwald M., Jencks W. P., Biochemistry, 7, 844 (1968).
5. Yoshizawa T., Wald G., Nature, 214, 566 (1967).
6. Yoshizawa T., Wald G., Nature, 197, 1279 (1963).
7. Trayzer K. A., Colowick S. P., Arch. Biochem. Biophys., 94, 161 (1961).
8. Inouye K., Fruton J. S., Biochemistry, 6, 1765 (1967).
9. Koshland D. E., Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, 98 (1958).
10. Koshland D. E., Jr., Advan. Enzymol., 22, 45 (1960); Koshland D. E., Jr., Neet K. E., Ann. Rev. Biochem., 37, 359 (1968).
11. Bernhard S. A., Gutfreund H., Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem. Tokyo Kyoto, 1958, 124.
12. Bernhard S. A., J. Cellular Comp. Physiol., 54, (Suppl. 1), 256 (1959).
13. Spencer T., Sturtevant J. M., J. Am. Chem. Soc., 81, 1874 (1959).
14. Hein G. E., Niemann C., J. Am. Chem. Soc., 84, 4495 (1962).
15. Niemann C., Science, 143, 1287 (1964).
16. Hamilton C. L., Niemann C., Hammond G. S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 55, 664 (1966).
17. Ingles D. W., Knowles J. R., Biochem. J., 104, 369 (1967).
18. Hofstee B. H. J., Biochim. Biophys. Acta, 24, 211 (1957); 32, 182 (1959); J. Biol. Chem. 207, 219 (1954).
19. Lumry R. in Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. (eds.) «The Enzymes», vol. 1, Academic Press Inc., New York, 1959, p. 157.
20. Cane W. P., Wettlaufer D., Abstr. Am. Chem. Soc., 152d Ann. Meeting 1966, 110C.
21. Bender M. L., Kézdy F. J., Gunter C. R., J. Am. Chem. Soc., 86, 3714 (1964).
22. Inagami T., J. Biol. Chem., 240, PC 3453 (1965).
23. Ingram J. M., Wood W. A., J. Biol. Chem., 241, 3256 (1966).
24. Cardinale G., Abeles R., personal communication (1965).
25. Wang S., Kawahara F. S., Talalay P., J. Biol. Chem., 238, 576 (1963).
26. DeLuca M., McElroy W. D., Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, 836 (1965).
27. Norris A. T., Berg P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 330 (1964).
28. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R., Proc. Roy. Soc. (London), 167, 378 (1967B); Phillips D. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 484 (1967).
29. Rupley J. A., Butler L., Gerring M., Hartdegen F. J., Pecoraro R., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 1088 (1967).
30. Rupley J. A., Gates V., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 496 (1967).
31. Chipman D. M., Grisaro V., Sharon N., J. Biol. Chem., 242, 4388 (1967).
32. Pollock J. J., Chipman D. M., Sharon N., Arch. Biochem. Biophys., 120, 235 (1967); Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 779 (1967).
33. Williams R. J. P., Protides Biol. Fluids Proc. Colloq., 14, 25 (1966).
34. Kumamoto J., Cox J. R., Jr., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., 78, 4858 (1956).
35. Haake P. C., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., 83, 1102 (1961).
36. Kaiser E. T., Panar M., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., 85, 602 (1963).
37. Covitz F., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., 85, 1773 (1963); Ramirez F., Madan O. P., Desai N. B., Meyerson S., Banas E. M., ibid., p. 2681.
38. Fava A., Ilceto A., Camera E., J. Am. Chem. Soc., 79, 833 (1957).
39. White E. H., Dolak L. A., J. Am. Chem. Soc., 88, 3790 (1966).
40. Colter A. K., Clemens L. M., J. Am. Chem. Soc. 87, 847 (1965).
41. Lovrien R., Linn T., Biochemistry, 6, 2281 (1967).
42. Kohlschütter H. W., Ann. Chem., 482, 75 (1930); Kohlschütter H. W., Sprenger L., Z. Physik. Chem. Abstr., B 16, 284 (1932); cf. Morawetz H., Science, 152, 705 (1966).
43. Leffler J. E., Grunwald E., Rates and Equilibria of Organic Reactions, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1963, p. 408.

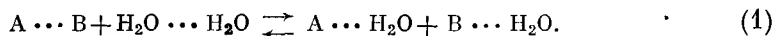
44. *Burke J. J., Hammes G. G., Lewis T. B.*, J. Chem. Phys., **42**, 3520 (1965).
45. *Schwartz G.*, J. Mol. Biol., **11**, 64 (1965).
46. *Fincham J. R. S.*, Biochem. J., **65**, 721 (1957).
47. *Tarmy E. M., Kaplan N. O.*, J. Biol. Chem., **243**, 2579, 2587 (1968).
48. *Grisolia S.*, Physiol. Rev., **44**, 657 (1964); *Worcel A., Goldman D. S., Cleland W. W.*, J. Biol. Chem., **240**, 3399 (1965); *Kearney E. B.*, *ibid.*, **229**, 363 (1957); *Sundaram T. K., Fincham J. R. S.*, J. Mol. Biol., **10**, 423 (1964); *Wang J. H., Shonka M. L., Graves D. J.*, Biochemistry, **4**, 2296 (1965).
49. *Hammes G. G., Fasella P.*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 4644 (1962).
50. *French T. C., Hammes G. G.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 4669 (1965); *Cathou R. C., Hammes G. G.*, *ibid.*, p. 4674.
51. *Havsteen B. H.*, J. Biol. Chem., **242**, 769 (1967).
52. *Erman J. E., Hammes G. G.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 5607, 5614 (1966).
53. *Kirschner K., Eigen M., Bittman R., Voigt B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **56**, 1661 (1966).
54. *Sigler P. B., Jeffery B. A., Matthews B. W., Blow D. M.*, J. Mol. Biol., **15**, 175 (1966).
55. *Steitz T. A., Ludwig M. L., Quirocho F. A., Lipscomb W. N.*, J. Biol. Chem., **242**, 4612 (1967).
56. *Antonini E.*, Science, **158**, 1417 (1967).
57. *Reynolds J. A., Schlesinger M. J.*, Biochemistry, **6**, 3552 (1967).
58. *Kirsch J. F., Katchalski E.*, Biochemistry, **4**, 884 (1965).
59. *Kirsch J. F., Igelström M.*, Biochemistry, **5**, 783 (1966); *Krupka R. M.*, *ibid.*, **3**, 1749 (1964).
60. *Mudd S. H., Mann J. D.*, J. Biol. Chem., **238**, 2164 (1963).
61. *Hammett L. P.*, Physical Organic Chemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 1940, pp. 76, 118.
62. *Chen D. T. Y., Laidler K. J.*, Trans Faraday Soc., **58**, 480 (1962); *Ebersson L., Wadsö I.*, Acta Chem. Scand., **17**, 1552 (1963).
63. *Bruice T. C., Benkovic S. J.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1 (1963).
64. *Tommila E., Hinshelwood C. N.*, J. Chem. Soc., 1938, 1801.
65. *Hammett L. P.* [61], p. 83.
66. *Hepler L. G.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3089 (1963); *Ko H. C., O'Hara W. F., Hu T., Hepler L. G.*, *ibid.*, **86**, 1003 (1964).
67. *Pitzer K. S.*, J. Am. Chem. Soc., **59**, 2365 (1937).
68. *Ritchie C. D., Sager W. F.*, Progr. Phys. Org. Chem., **2**, 323, (1964).
69. *Bell R. P.*, The Proton in Chemistry, chap. 5, Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1959.
70. *Atkinson D. E.*, Ann. Rev. Biochem., **35**, 85 (1966); *Stadtman E. R.*, Advan. Enzymol., **28**, 41 (1966); *Koshland D. E., Jr., Neet K. E.*, Ann. Rev. Biochem., **37**, 359 (1968).
71. *Monod J., Changeux J.-P., Jacob F.*, J. Mol. Biol., **6**, 306 (1963).
72. *Koshland D. E., Jr., Némethy G., Filmer D.*, Biochemistry, **5**, 365 (1966).
73. *Gerhart J. C., Pardee A. B.*, Fed. Proc., **23**, 727 (1964); *Gerhart J. C., Schachman H. K.*, Biochemistry, **4**, 1054 (1965).
74. *Kuramitsu H., Moyed H. S.*, J. Biol. Chem., **241**, 1596 (1966).

Часть вторая

Силы, действующие в водном растворе

Обычно исследователи не полностью отдают себе отчет в том, как мало известно и экспериментально, и теоретически о силах взаимодействия между молекулами в водном растворе. Знание природы и оценка величины этих сил являются фундаментально важными для понимания механизмов реакций, протекающих в водной среде, и особенно важны при рассмотрении реакций, в которых ускорение вызывается взаимодействием реагентов в точках, не совпадающих с реагирующими атомами. Именно благодаря этим силам взаимодействия ферменты проявляют свою специфическую каталитическую активность. При этом силы взаимодействия обеспечивают связывание субстрата и, по всей вероятности, вносят значительный вклад в понижение свободной энергии активации катализируемой реакции.

Самой важной характеристикой всех межмолекулярных сил в водном растворе является то, что они в большей степени зависят от свойств этого необычайного растворителя, чем от собственной природы и величины. Взаимодействие воды с ионами, диполями и донорами или акцепторами водородной связи настолько велико, что приводит к понижению или исчезновению большинства сил, ответственных за сильное межмолекулярное взаимодействие в вакууме или в неполярном растворителе. Таким образом, энергия большинства межмолекулярных взаимодействий в водном растворе представляет собой малую разность больших чисел, т. е. разность между энергией взаимодействия двух молекул А и В и энергией их взаимодействия с водой [уравнение (1)]:



Фактически наиболее важные нековалентные межмолекулярные силы, возникающие в водном окружении, являются скорее всего следствием сильного взаимодействия молекул воды между собой, а не результатом непосредственного взаимодействия молекул растворенного вещества друг с другом. Большая плотность энергии сцепления молекул воды, возникающая из-за большого числа водородных связей на единицу объема этого растворителя, затрудняет разъединение молекул воды, необходимое для внедрения слабо-взаимодействующей молекулы в раствор. Поэтому сравнительно мало полярные молекулы, которые имеют *минимальную* тенденцию к образованию межмолекулярных связей в вакууме и не могут достаточно сильно взаимодействовать с водой, вытесняются из водной среды и вынуждены взаимодействовать между собой.

ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ *

А. ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ОБРАЗОВАНИЯ ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

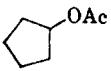
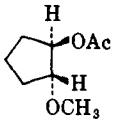
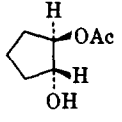
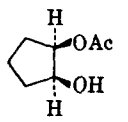
1. ЭФФЕКТЫ УСКОРЕНИЯ РЕАКЦИЙ

Некоторые примеры реакций в водном растворе, для которых показано, что образование водородной связи вызывает их ускорение, были описаны в главах, посвященных эффектам сближения, ковалентному катализу и общему кислотно-основному катализу. Величина энергии стабилизации переходного состояния, которая может возникнуть в результате образования водородной связи, невелика, но вполне ощутима и существенно больше, чем понижение энергии при образовании водородных связей в комплексах, находящихся в водном растворе в основном состоянии. Это происходит, вероятно, потому, что основность или кислотность переходного состояния может быть намного выше, чем равновесного основного состояния (гл. 3).

Часто полагают, что водородная связь ответственна за высокую реакционную способность ацильных групп в ацилированных производных рибозы, таких, как 2'(3')-аминоацил-РНК,— система, которая особенно инте-

Таблица 1

Влияние соседних гидроксильных групп на скорость гидролиза эфиров уксусной кислоты [4]

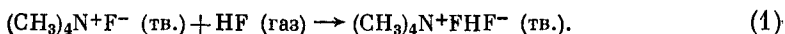
Эфир	k_{OH^-} (73 °C), л/моль · мин	$\Delta S^\ddagger$, ккал/моль
	9,3	-10,7
 <i>транс</i>	31,6	-9,2
 <i>транс</i>	174	-6,3 (водородная связь с C=O в CCl ₄)
 <i>цис</i>	309	-2,7 (водородная связь с C—O—C в CCl ₄)

* Для более подробного ознакомления с рассматриваемыми здесь вопросами см. [1].

ресна для биохимии. Исследование скоростей гидролиза и гидроксиламинолиза модельных соединений, несущих ацилированную гидроксильную группу на пятичленном кольце, показывает, что имеется определенный эффект ускорения в присутствии гидроксильной группы, находящейся по отношению к ацильной либо в *цис*-, либо в *транс*-положении, но что этот эффект невелик (обычно около одного порядка) и что существенный вклад в возрастание реакционной способности ацилированных производных рибозы может быть обусловлен просто индукционными эффектами присоединенной гидроксильной группы и атома кислорода кольца [2]. Более того, хотя эти соединения «энергетически богаты» со свободной энергией гидролиза того же порядка, как и у концевой фосфатной группы АТФ, их высокий потенциал при нейтральных значениях рН является отражением общих свойств сложных эфиров и незначительно превышает потенциал других сложных эфиров без соседней гидроксильной группы, как в рибозе [3]. Исследование инфракрасных спектров *цис*- и *транс*-циклопентадиолмоноацетатов указывает на то, что существуют (в четыреххлористом углеороде) два типа водородных связей — с карбонильным и с эфирным кислородом сложноэфирной группы (табл. 1) [4]. По-видимому, обе эти связи ответственны за наблюдаемое ускорение реакции в воде. Это 15—30-кратное ускорение, вызываемое соседней гидроксильной группой, включает трехкратное ускорение благодаря индукционному эффекту (что видно на примере соединения, содержащего метокси-группу) и 5—10-кратное ускорение, специфичное для гидроксильной группы, названное «внутренним сольватационным эффектом» [4]. Последний эффект, вероятно, связан с образованием в переходном состоянии водородной связи между атомом кислорода сложноэфирной группы и соседней гидроксильной группой с вытеснением связанной молекулы воды. Такая интерпретация подтверждается сравнительно благоприятной энтропией активации при гидролизе соединений с соседней гидроксильной группой (табл. 1).

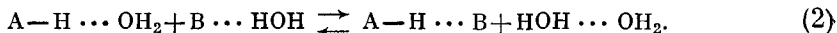
2. МЕЖМОЛЕКУЛЯРНАЯ ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ

Водородная связь в ионе $(F-H-F)^-$ является самой прочной из всех известных водородных связей. Образование этой связи при взаимодействии фтористого водорода с твердым фторидом сопровождается небольшим изменением кристаллической решетки последнего с выделением 37 ккал/моль ($155 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль}$) тепла {уравнение (1)} [5]:



Обычно величина энергии образования водородной связи в неполярных растворителях или в твердом состоянии лежит в пределах от -5 до -10 ккал/моль (от -21 до $-42 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль}$).

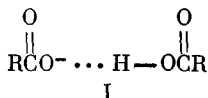
Вода проявляет свойства как донора, так и акцептора водорода, так что при образовании межмолекулярных водородных связей в водном растворе необходим разрыв водородных связей между молекулами растворенного вещества и водой:



Прочность образующейся водородной связи, следовательно, зависит только от разности энергий связей по обоим сторонам уравнения (2), а не от абсолютной величины энергии связи $A-H \dots B$. Несмотря на то что часто предполагают, что водородная связь играет важную роль при ассоциации в водных растворах, существует очень мало экспериментальных данных, которые количественно подтверждали бы эти предположения. Фактически только в одном случае имеются прямые доказательства образования монофункциональной межмолекулярной водородной связи в водном растворе — ион бифторида. При этом энергия связи в воде намного меньше, чем в твердом

состоянии. В спектре ЯМР иона фторида сигнал смещается при добавлении к водному раствору фторида кислоты в результате образования иона $(F-H-F)^-$. Из зависимости этих смещений от концентраций реагентов получается значение 4 л/моль для константы равновесия $K = [FHF^-]/[HF][F^-]$ в присутствии 0,25 моль/л соли [6]. Такая же величина была получена из данных потенциометрического титрования фтористого водорода при разных его концентрациях [7]. Последняя величина менее убедительна, так как при титровании возникает проблема учета коэффициента активности. Константе равновесия, равной 4 л/моль, соответствует свободная энергия образования водородной связи только $-0,8$ ккал/моль ($-3,35 \times 10^3$ Дж/моль). Сопоставляя эту величину с теплотой образования той же связи в твердом состоянии -37 ккал/моль ($-155 \cdot 10^3$ Дж/моль), легко заметить огромный «нивелирующий» эффект воды как растворителя. Маловероятно, чтобы изменения энтропии могли объяснить в какой-то мере эту большую разницу. Известны косвенные доказательства существования аналогичных водородных связей в частицах $(H_2PO_4-H-O_4PH_2)^-$ и $(IO_3-H-O_3I)^-$, имеющих константы устойчивости 3 и 4 л/моль соответственно [8].

Так как прочность водородной связи с ростом кислотности донора и с ростом основности акцептора протона возрастает, то легче всего водородные связи должны образовываться в парах сопряженных кислот и оснований, таких, как уксусная кислота и ацетатный ион, которые относительно друг друга имеют максимально возможные кислотность и основность (I).

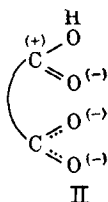


Высказывалось предположение, что небольшие отклонения от теоретической кривой титрования, которые наблюдаются при титровании смесей уксусной кислоты и ацетата с ростом их концентраций, вызываются ассоциацией такого типа. Однако константа ассоциации 0,1 л/моль указывает на то, что эта водородная связь, если она вообще существует, намного слабее, чем у аниона бифторида в воде [9]. В общем очень трудно, а иногда даже невозможно, отличить такую слабую ассоциацию от солевого эффекта или других эффектов, приводящих к изменению коэффициентов активности и, следовательно, влияющих на ход кривой титрования [10]. Более того, ассоциация, если она даже существует, скорее может быть объяснена гидрофобным взаимодействием, чем водородной связью, так как кажущаяся константа ассоциации возрастает с ростом углеводородной цепи титруемой кислоты, начиная с муравьиной [11].

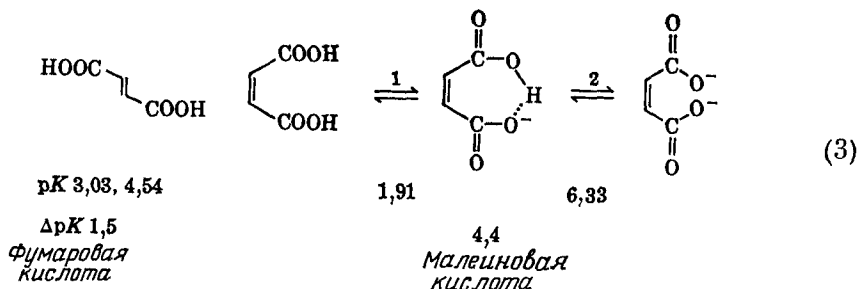
3. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ

Намного более обоснованы доказательства существования *внутримолекулярной* водородной связи между карбоксильными группами в воде. Образование такой связи облегчается тем, что при этом нет потерь в энтропии ассоциации, которые необходимы для сближения молекул в растворе. Однако на самом деле существование внутримолекулярной водородной связи не доказывает того, что водородная связь между карбоксильными группами, одна из которых находится в ионизированном состоянии, обладает заметной большей прочностью в воде, потому что эти связи обнаруживаются только в тех молекулах, структура которых почти полностью исключает отсутствие водородной связи. Действительно, иное, без образования водородной связи, расположение карбоксильной группы и аниона карбоксила приводило бы к возрастанию энергии молекулы из-за электростатического отталкивания между анионом и отрицательно заряженным концом карбоксильного диполя

кислоты (например, II).



Существование внутримолекулярных водородных связей впервые было отмечено при установлении особой устойчивости моноанионов дикарбоновых кислот. Стабилизация водородной связью проявляется в увеличении константы диссоциации K_1 свободной кислоты и уменьшении константы диссоциации моноаниона K_2 по сравнению с кислотами, в которых образование водородной связи невозможно. Это приводит к большей разнице ΔpK между pK_1 и pK_2 для дикарбоновых кислот, в которых возможно образование водородной связи. Подобные различия очевидны при сравнении констант диссоциации малеиновой и фумаровой кислот [схема (3)]



Однако такая интерпретация является чрезмерно упрощенной из-за пренебрежения электростатическими взаимодействиями между карбоксильными группами. Действительно, энергетически неблагоприятное отталкивание отрицательных зарядов в дианионе более значительно для малеиновой, чем для фумаровой кислоты; кроме того, в этом случае игнорируются ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия в моноанионе и кислоте. Величину этих электростатических эффектов трудно оценить вследствие неопределенности в величине микроскопической диэлектрической проницаемости в областях вокруг и между карбоксильными группами. Вестхеймер и Кирквуд приближенно рассмотрели эту проблему, приняв, что кислота находится в полости с низкой диэлектрической проницаемостью, равной примерно 2,0, как и в углеводородах, и окруженной растворителем с нормальной величиной диэлектрической проницаемости [42]. В их приближении изменение pK , вызываемое электростатическим взаимодействием, можно вычислить при помощи «эффективной диэлектрической проницаемости» D_E , которую можно оценить на основании принятой модели и определенных допущений о геометрии полости по уравнениям (4) и (5) для ион-ионного и ион-дипольного взаимодействий соответственно:

$$\Delta pK = \frac{e^2}{2,303 D_E R k T}, \quad (4)$$

$$\Delta pK = \frac{e \mu \cos \xi}{2,303 D_E R^2 k T}. \quad (5)$$

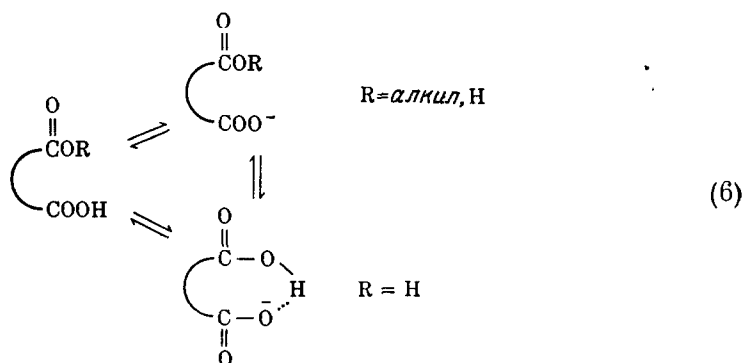
В уравнении (5) μ — дипольный момент, ξ — угол между осью диполя и линией, соединяющей его с зарядом. Тенфорд отметил, что эта модель очень чувствительна к глубинам погружения заряда и диполя в полость,

и нашел, что вычисления электростатических взаимодействий для ряда ионизирующихся групп приводят к удовлетворительным результатам в предположении, что заряды находятся на глубине 1 Å, а диполи — на глубине 1,5 Å под поверхностью полости [13].

Эти модели, очевидно, не вполне соответствуют реальной картине, создающейся в такой сложной ситуации. Использование «эффективной диэлектрической проницаемости» и представления о «глубине погружения в полость» дают лишь полуэмпирические пути решения проблемы определения микроскопической диэлектрической проницаемости, диэлектрического насыщения, максимального приближения молекул растворителя и других величин. Тем не менее эти пути логически непротиворечивы и позволяют оценить влияние электростатических сил на константы диссоциации ряда ионизирующихся групп, не образующих водородных связей. В случае дикарбоновых кислот, способных к образованию водородной связи, они должны давать по крайней мере грубую оценку вклада электростатических сил в наблюдаемый сдвиг pK . Подобные оценки указывают на то, что электростатические эффекты могут объяснить в основном все отклонения в константах диссоциации как малеиновой кислоты по сравнению с фумаровой, так и ряда других дикарбоновых кислот [14, 15]. Приближенность вычислений не позволяет сделать однозначный вывод о том, что образование водородной связи в рассмотренных случаях несущественно, однако становится очевидной необходимость ряда независимых доказательств при установлении наличия водородной связи в этих соединениях.

Гораздо большие значения ΔpK наблюдаются у карбоновых кислот с объемистыми заместителями, которые заставляют карбоксильные группы максимально сближаться между собой: значения pK *рацемической* 2,3-дигидро-бутилинтарной кислоты равны 2,2 и 10,25, что приводит к очень большой величине $\Delta pK = 8$ [16]. Большие значения ΔpK для этих кислот можно объяснить как образованием сильной водородной связи в моноанионе (чему благоприятствуют большие заместители), так и сильным электростатическим отталкиванием двух связанных отрицательных зарядов в дианионе, которое, возможно, усилено десольватирующим действием заместителей.

Более простой эмпирический подход заключается в сравнении значений pK дикарбоновой кислоты, в которой ожидается образование внутримолекулярной водородной связи, и соответствующего моноэфира {схема (6)} [17].

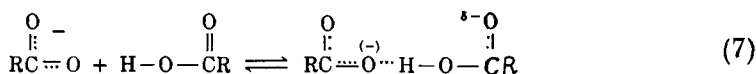


Полярные эффекты атома водорода в дикарбоновой кислоте и алкильной группы в моноэфире отличаются незначительно, так что стабилизация моноаниона, вызываемая образованием водородной связи, должна проявляться в понижении pK_1 дикарбоновой кислоты по сравнению с моноэфиром. При этом необходимо вносить статистическую поправку в константу диссоциации дикарбоновой кислоты на множитель, равный 2, так как в кислоте ионизируются две эквивалентные группы, а в эфире — только одна. Разница

в величинах pK малеиновой кислоты ($pK = 1,91$) и ее моноэфира ($pK = 3,08$) соответствует примерно 14-кратной разнице в константах диссоциации. Отсюда следует, что стабилизация моноаниона водородной связью приводит к 7-кратной разнице в константах. Это небольшой, но, по-видимому, вполне реальный эффект.

Другое подтверждение существования циклической водородной связи в моноанионах дикарбоновых кислот подходящей структуры, таких, как малеат, следует из наблюдений сдвигов в спектрах ЯМР протонов углеводородного остова этих кислот. Положение сигнала в спектре ЯМР смещается в сторону *слабого* поля при ионизации кислоты до моноиона, тогда, как обычно, ионизация карбоновых кислот, которые не могут образовывать внутримолекулярных водородных связей, таких, как фумаровая кислота, сопровождается смещением сигналов протонов при α - и β -углеродных атомах в сторону *сильного* поля [18]. К сожалению, теоретическая интерпретация этих смещений еще не вполне определена.

Образование водородной связи между двумя карбоксильными группами, одна из которых находится в ионизированном состоянии, должно приводить к укорочению связи в карбонильной группе аниона, который становится похожим на недиссоциированную карбоксильную группу, и к удлинению связи в карбонильной группе кислоты, которая приближается к ионизированному состоянию [уравнение (7)]



Такие изменения должны проявляться в валентных частотах этих групп в инфракрасной области. Инфракрасные спектры растворенных в окиси дейтерия кислот, в которых может существовать внутримолекулярная водородная связь, подтверждают, хотя и не вполне согласованно, это предположение [15, 19, 20]. Карбоксильная группа моноаниона ди-*n*-пропилмалоновой кислоты дает ожидаемый сдвиг в область низких частот по сравнению с моноанионом малоновой кислоты, что указывает на присутствие внутримолекулярной водородной связи в первом соединении. Однако моноанион малеиновой кислоты обнаруживает небольшой сдвиг в противоположном направлении по сравнению с фумаратом (табл. 2). В салицилате по срав-

Таблица 2

**Валентные частоты карбонильной группы
в инфракрасных спектрах моноанионов карбоновых
кислот в окиси дейтерия [20]**

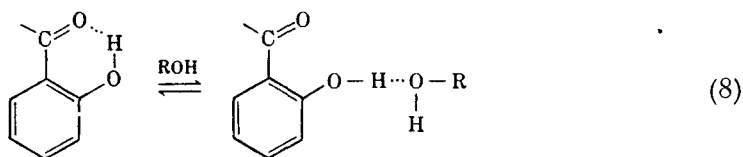
Моноанион	ν -COOH, см ⁻¹	$\nu_{\text{асимм}}$ -COO ⁻ , см ⁻¹
Малеат	1698	1570
Фумарат	1690	1577
Малонат	1698	1588
Ди- <i>n</i> -пропилмалонат	1677	1586
Салицилат	—	1621
Бензоат	—	1553

нению с бензоатом наблюдается значительный сдвиг частоты в том направлении, которое ожидается в случае образования водородной связи в первом анионе, однако отсутствует возрастание в частоте ионизированной карбоксильной группы ди-*n*-пропилмалоната по сравнению с малонатом. Наблюдаются большие различия в сдвиге частоты карбонильной группы, который возникает при ионизации соседней карбоксильной группы [20]. Следует,

однако, быть осторожным при интерпретации этих изменений как доказательства образования водородной связи, так как сдвиг частоты карбоксильной группы может до некоторой степени отражать отклонение частоты в моноанионе по сравнению с дианионом, вызываемое электростатическим взаимодействием.

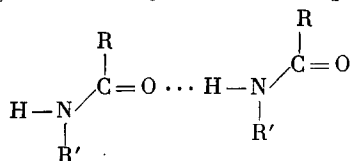
Самое убедительное доказательство существования внутримолекулярной водородной связи следует из измерений скоростей удаления протона гидроксильным ионом из карбоновой кислоты, содержащей водородную связь [21, 22]. Константы скорости удаления протона из бензойной и уксусной кислот, составляющие $3,5 \cdot 10^{10}$ и $4,5 \cdot 10^{10}$ л/моль·с соответственно, не зависят от силы кислоты и находятся в пределах констант скоростей процессов, лимитируемых диффузией. В противоположность этому константы скорости удаления протона из моноанионов ди-*n*-пропилмалоновой и малоновой кислот, а также из салицилатной группы молекулы красителя составляют $5,3 \cdot 10^7$, $7,4 \cdot 10^8$ и $1,4 \cdot 10^7$ л/моль·с соответственно [21]. В ряду моноанионов константы скорости изменяются обратно пропорционально отношению констант диссоциации K_1/K_2 [22]. Уменьшение этих скоростей на несколько порядков по сравнению со скоростями диффузионно контролируемых процессов, наблюдаемыми для других кислот, указывают на тормозящую роль каких-то факторов в этих реакциях. Наиболее вероятным объяснением является предположение об образовании внутримолекулярной водородной связи, в результате чего понижается способность протона к реакции с ионом гидроксид-иона.

Способность гидроксилсодержащих растворителей разрывать водородную связь, даже в случае особо благоприятной обстановки для ее образования, видна на примере салицилальдегида и *o*-оксибензофенонов [23]. Бензальдегиды и бензофеноны обычно обладают флуоресценцией, связанной с дезактивацией триплетного состояния. В неполярных растворителях присутствие в *орто*-положении гидроксильной группы приводит к исчезновению флуоресценции вследствие быстрого тушения возбужденного триплетного состояния протоном образовавшейся внутримолекулярной водородной связи. Добавление гидроксилсодержащего растворителя, например этанола, приводит к возобновлению нормальной флуоресценции, вероятно, потому, что образование межмолекулярной водородной связи с таким растворителем приводит к разрыву внутримолекулярной водородной связи с карбонильной группой [схема (8)]



4. БЕЛКИ, ПЕПТИДЫ И МОЧЕВИНА

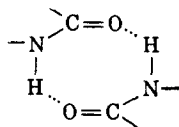
Водородная связь между амидными группами в α -спирали и других регулярных структурах, встречающихся в белках (III), представляет наибольший интерес, так как участвует в поддержании белковой структуры. Поэтому важно установить, обладает ли такая водородная связь в воде достаточной устойчивостью, чтобы служить движущей силой образования таких структур.



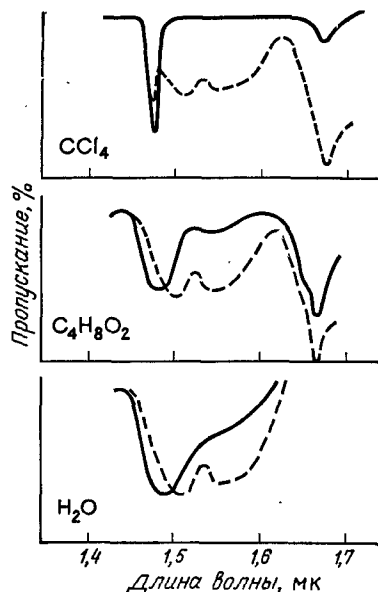
III

Во второй части данного раздела было отмечено, что, за исключением особых случаев, таких, как ион бифторида, монофункциональные водородные связи между небольшими молекулами в водном растворе чрезвычайно неустойчивы. Этот вывод распространяется также и на водородные связи между амидами.

Возникновение межмолекулярной водородной связи между молекулами N-метилацетамида в четыреххлористом углероде было подтверждено обнаружением сдвига обертона валентной частоты связи N—H-амида из высокочастотной области (где поглощает мономер) в низкочастотную область, где находится широкая полоса поглощения димера или полимера, появляющихся при возрастании концентрации амида от 0,01 до 1,0 моль/л (рис. 1) [24]. В диоксане атомы кислорода молекул растворителя конкурируют с амидными карбонильными группами в качестве акцептора водорода, и в этом растворителе необходимо повысить концентрацию амида до 3 моль/л, чтобы получить полосу поглощения агрегата. В воде, молекулы которой конкурируют как с донором, так и с акцептором водорода, полоса поглощения агрегата не появляется до тех пор, пока присутствует значительное количество воды и частицы, связанные межмолекулярной водородной связью, появляются только в почти чистом N-метилацетамиде, когда его концентрация превышает концентрацию воды (рис. 1). Из этих результатов следует, что водородные связи между отдельными молекулами амида не обладают заметной устойчивостью в водном растворе. Изменение коэффициента активности мочевины в концентрированном растворе можно объяснить образованием димеров мочевины при помощи водородной связи [25]. Однако спектральные исследования в ближней инфракрасной области, проведенные для растворов мочевины и δ-валеролактама [соединений, в принципе способных образовывать циклические димеры (IV)], не подтверждают образования этими соединениями в воде устойчивой водородной связи [24, 26].



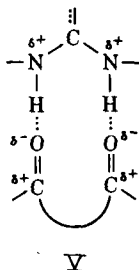
IV



Р и с. 1. Спектры мономера и связанного водородной связью димера или агрегата N-метилацетамида в ближней инфракрасной области в растворах в четыреххлористом углероде, диоксане и воде. Концентрации растворенного вещества: в CCl_4 — 0,01 моль/л, 1 моль/л; в диоксане — 0,2 моль/л, 3 моль/л; в воде — 12,5 моль/л [24].

Таким образом, отсутствуют надежные доказательства, подтверждающие широко принимавшуюся до сих пор гипотезу о том, что водородные связи между амидными группами обеспечивают энергию стабилизации, необходимую для поддержания нативной структуры белков, и о том, что денатурирующие агенты типа мочевины и гидрохлорида гуанидина вызывают денатурацию, конкурируя с карбонильным кислородом и амидным водородом за образование водородной связи внутри пептидной цепи [27]. После осозна-

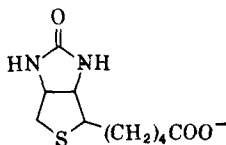
может давать существенный вклад в движущую силу межмолекулярного взаимодействия в воде. Ниже приведена (V) одна из возможных структур, возникающих при образовании водородной связи между мочевиной или гидрхлоридом гуанидина и карбонильными группами полипептида



Аналогичная ситуация возникает при связывании ионов металлов хелатными агентами. Так, магний образует с ацетатом очень неустойчивый в водном растворе комплекс, однако комплекс иона магния с этилендиаминтетраацетатом, в котором четыре карбоксильные группы объединены в одной молекуле, очень устойчив.

Связывание сахаров с белками в водном растворе также можно объяснить с точки зрения образования полифункциональной водородной связи. Определенный вклад в этот процесс может вносить и гидрофобное взаимодействие, однако из-за высокой растворимости большинства сахаров в воде можно полагать, что связывание обуславливается не только этим взаимодействием. Значительный вклад в свободную энергию взаимодействия лактозы с антителом, достигающую -8 ккал/моль ($-33,5 \cdot 10^3$ Дж/моль), можно поэтому приписать образованию полифункциональной водородной связи с гидроксильными группами сахара [34]. Свободная энергия связывания три-N-ацетилглюкозамина с лизоцимом составляет $-7,2$ ккал/моль ($-30,2 \times 10^3$ Дж/моль). Если принять, что приблизительно половина этой величины обусловлена образованием водородных связей, то каждой из наблюдаемых при рентгеноструктурном анализе этого фермента водородной связи можно приписать среднюю свободную энергию образования $-0,8$ ккал/моль ($-3,35 \cdot 10^3$ Дж/моль) [35].

Одно из важных доказательств того, что взаимодействие мочевины с белком может сопровождаться большим изменением свободной энергии, следует из изучения связывания биотина с авидином. В свободную энергию этого процесса уреидная группа биотина вносит вклад более чем 10 ккал ($42 \cdot 10^3$ Дж).



биотин

Отметим также, что этиленмочевина и мочевина связываются с авидином с константами ассоциации 10^2 – 10^3 [36]. Это сильное взаимодействие трудно объяснить исходя из того, что известно сейчас об энергиях взаимодействий в водном растворе, однако образование водородной связи между уреидной группой и подходящим образом ориентированными группами на белке почти наверное имеет большое значение.

Б. СВОЙСТВА ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ

Для многих целей полезно рассмотреть водородную связь в качестве некоторого промежуточного состояния в процессе переноса протона от кислоты к основанию [схема (9)]

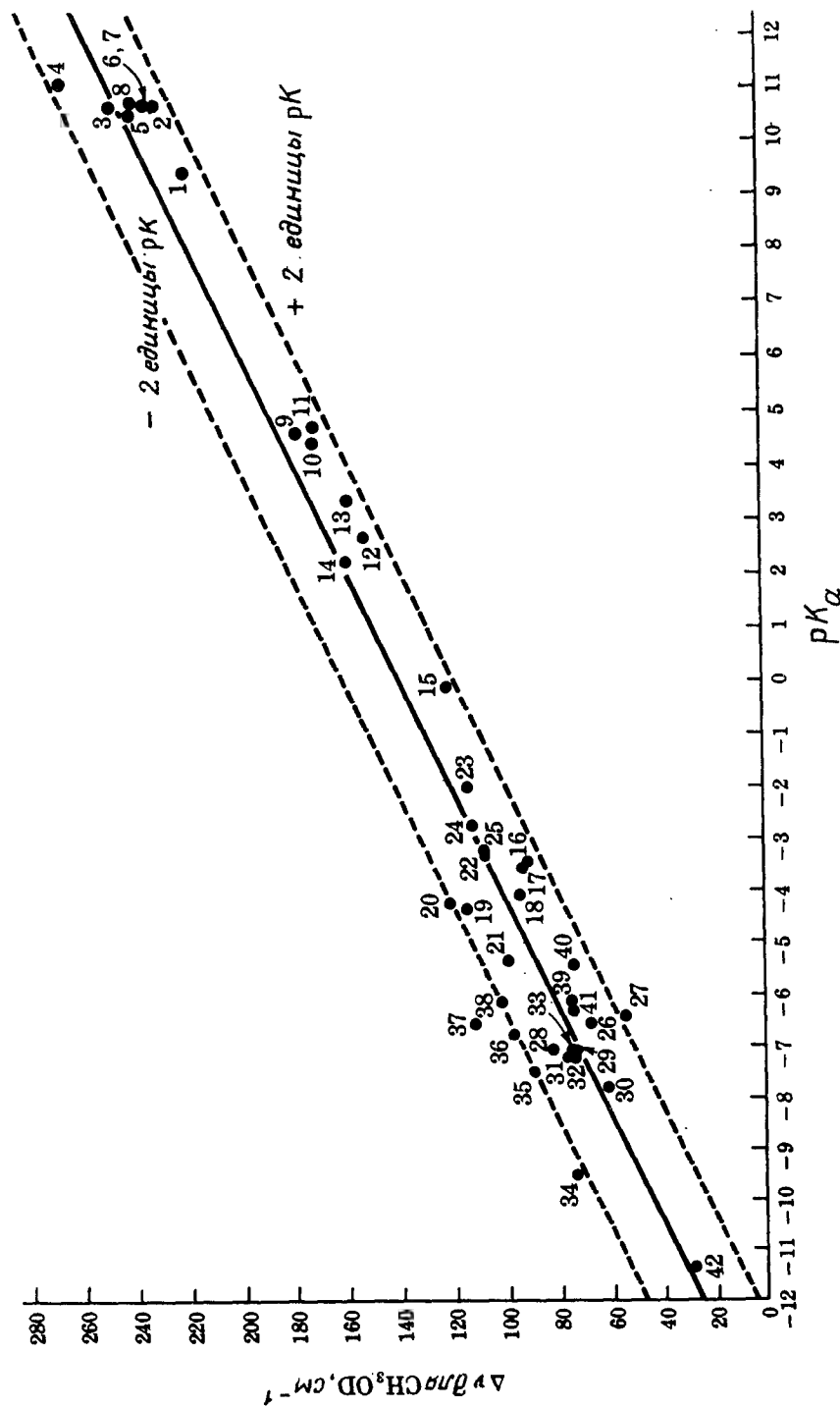


Кислота взаимодействует с основанием таким образом, что возникающая между протоном и основанием связь приводит к растяжению и ослаблению $\text{A} - \text{H}$ -связи. Если основание B оказывается достаточно сильным по отношению к A^- [заряды в схеме (9) имеют произвольную величину], протон в положении равновесия будет ближе к B и A^- будет удерживаться слабой водородной связью. При полном переносе протона и разделении молекул образуются A^- и BH^+ . Таким образом, ясно, что сила водородной связи будет возрастать с ростом кислотности (протонодонорной способности) донора протона и с ростом основности (протоноакцепторной способности) акцептора протона.

Такая корреляция действительно существует, если рассматривать структурноаналогичные соединения или если выбрать такие широкие пределы, чтобы наблюдаемые отклонения стали несущественными. Строгая корреляция отсутствует при сравнении соединений различных классов, особенно если изменяется природа донорного или акцепторного атомов. При образовании водородной связи между CH_3OD и различными основаниями с возрастающей основностью наблюдается увеличение длины связи $\text{O} - \text{D}$ (о чем можно судить по изменениям валентной частоты этой связи в инфракрасной области), и это увеличение приблизительно пропорционально значению pK основания при изменении основности более чем на двадцать порядков (рис. 3) [37,38]. Более внимательное рассмотрение отдельных участков этой зависимости показывает, что существуют соединения, близкие по основности, но различные по структуре, которые существенно разнятся по силе образуемых ими водородных связей, мерой которой является сдвиг валентной частоты связи $\text{O} - \text{D}$. Замещенные пиридины, например, вызывают большие сдвиги в частоте связи $\text{O} - \text{D}$, чем алифатические амины той же основности. Однако в самом ряду замещенных пиридинов наблюдается корреляция между сдвигом частоты и величиной pK [39].

Лучшая корреляция наблюдается между валентной частотой связи $\text{O} - \text{H}$ и *энтальпией* образования водородной связи даже при сравнении акцепторов протонов, принадлежащих к различным классам соединений [39, 40]. Эта зависимость известна под названием *правила Беджера*. Исходя из этого можно предположить, что отклонения в корреляции с величиной pK (являющейся мерой свободной энергии) вызваны разницей в энтропиях образования водородной связи, как и следует ожидать при сравнении соединений различной структуры.

За последние годы были опубликованы результаты ряда прямых измерений свободной энергии образования водородной связи. Как правило, существует корреляция между эффектами заместителей (σ) и устойчивостью образующихся водородных связей. Типичная корреляция такого типа для ряда замещенных пиридинов и фенолов в четыреххлористом углероде приведена на рис. 4. Как и следовало ожидать, электронодонорные заместители в пиридине и электроноакцепторные заместители в феноле увеличивают

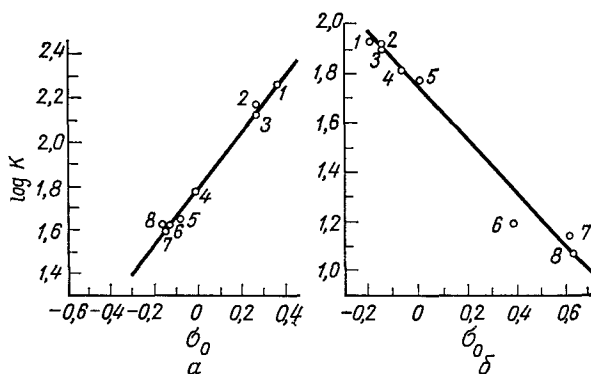


Р и с. 3. Влияние основности на прочность водородной связи, оценяемой по сдвигу валентной частоты связи $O-H$ в CH_3OD , при образовании водородной связи с различными основаниями [38].

1 — Бензиламин; 2 — n -бутиламин; 3 — n -пропиламин; 4 — диэтиламин; 5 — изобутиламин; 6 — n -амиламин; 7 — изоамиламин; 8 — циклогексаламин; 9 — анилин; 10 — o -толуидин; 11 — m -толуидин; 12 — o -хлоранилин; 13 — m -хлоранилин; 14 — метилантрамин; 15 — N,N -диметилацетамин; 16 — метил- n -бутиловый эфир; 17 — диэтиловый эфир; 18 — этил- n -бутиловый эфир; 19 — ди- n -пропиловый эфир; 20 — ди- n -пропиловый эфир; 21 — ди- n -бутиловый эфир; 22 — диметиловый эфир этиленгликоля; 23 — тетрагидрофуран; 24 — тетрагидропиран; 25 — диоксан; 26 — анизол; 27 — фенол; 28 — m -метилбензальдегид; 29 — m -метилбензальдегид; 30 — бензальдегид; 31 — метилбензоат; 32 — метилэтилкетон; 33 — метил- $tert$ -бутилькетон; 34 — циклобутанон; 35 — циклопентанон; 36 — циклогексанон; 37 — циклооктанон; 38 — циклооктанон; 39 — ацетофенон; 40 — n -бутирофенон; 41 — n -бутирофенон; 42 — нитробензол.

устойчивость водородной связи, причем из зависимости $\log K$ от значений σ для этих заместителей следуют величины ρ , равные $-1,0$ и $1,14$ соответственно [41].

Отклонения от корреляции между прочностью водородной связи и кислотностью или основностью могут вызываться рядом факторов: поляризуемостью, способностью к образованию ковалентных связей, «мягкостью» донорной или акцепторной молекулы. Несмотря на то что существующие представления о зависимости между этими факторами и прочностью водородной связи ни в коем случае нельзя считать вполне обоснованными, полезной оказывается эмпирическая корреляция, основанная на разделении энтальпии образования водородной связи на «электростатический» и «ковалентный» вклады. Из этих соображений следует, например, что водородные



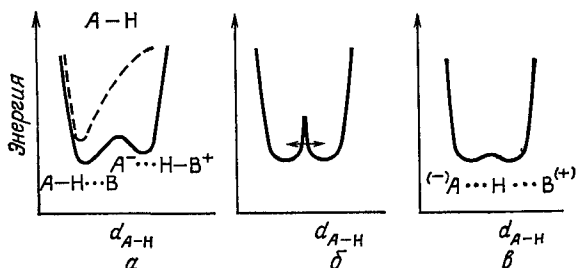
Р и с. 4. Влияние заместителей в феноле (а) и пиридине (б) на константы равновесия образования водородной связи между фенолами и пиридинами в четыреххлористом углеороде [41].

Заместители в феноле (а): 1 — $m\text{-Cl}$, 2 — $n\text{-I}$, 3 — $n\text{-Cl}$, 4 — H , 5 — $m\text{-CH}_3$, 6 — $n\text{-CH}_3\text{O}$, 7 — $n\text{-трет-бутил}$, 8 — $n\text{-CH}_3$; в пиридине (б): 1 — 4-трет-бутил, 2 — 4- CH_3 , 3 — 4- C_2H_5 , 4 — 3- CH_3 , 5 — H , 6 — 3- Br , 7 — 3- CN , 8 — 4- CN .

связи, образуемые фенолом, имеют существенно более ковалентный характер, чем связи, образуемые алифатическими спиртами или фтористым водородом [42]. Так как устойчивость межмолекулярной водородной связи в воде определяется небольшой разницей в энергиях взаимодействия молекул, образующих водородную связь с растворителем и между собой, специфические эффекты такого типа, влияющие на эту разность, чрезвычайно важны для установления того, в состоянии ли эти связи служить движущей силой процессов ассоциации в воде. К сожалению, в настоящее время имеется слишком мало экспериментальных данных для того, чтобы прийти к определенным выводам относительно устойчивости межмолекулярных водородных связей в воде, кроме констатации того факта, что она невелика.

На рис. 5, а показана зависимость потенциальной энергии от расстояния $A-H$, т. е. расстояния между атомом, участвующим в образовании водородной связи в молекуле AH , и протоном, для водородной связи типа изображенной на схеме (9). Эта зависимость характеризуется двумя минимумами, отвечающими двум асимметричным водородным связям, в которых протон расположен ближе к A или к B . Пунктирная линия отвечает потенциальной кривой связи $A-H$ в отсутствие B . В присутствии основания энергия системы понижается, а минимум смещается в сторону увеличения расстояния $A-H$ по сравнению со свободной молекулой AH . Кроме того, появляется новый минимум, отвечающий структуре $A^-\cdots H-B^+$. Если A и B сблизятся за счет более прочной водородной связи, то различие между двумя энергетическими минимумами будет сглаживаться, и в итоге может быть достигнута точка, в которой протон будет переходить из одного

положения в другое за время, меньшее чем период молекулярного колебания. Это может происходить либо в результате туннельного перехода между двумя потенциальными ямами, либо в результате понижения энергетического барьера между двумя положениями протона до незначительной величины (рис. 5, б, в). Другими словами, протон может существовать где-то между А и В, причем потенциальная кривая системы будет иметь фактически один минимум, отвечающий более или менее симметричной водородной связи. В таком случае нельзя уже говорить, что протон связан с А в водородной связи А—Н... В, так как протон связан с А и В в одинаковой степени и обычная валентная частота, соответствующая связи А—Н, при этом больше не наблюдается. Более того, если А и В эквивалентны, как в водородной



Р и с. 5. Диаграммы потенциальной энергии как функции расстояния А—Н для связи А—Н (.....); для связанной водородной связи системы А—Н...В с двумя потенциальными ямами (а); для системы, в которой происходит быстрый туннельный переход сквозь барьер между двумя потенциальными ямами (б); для сильной водородной связи с одной потенциальной ямой (в).

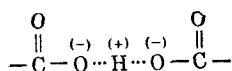
связи между двумя карбоксильными группами, они могут потерять свою индивидуальность, так что невозможно будет обнаружить порознь поглощение, соответствующее, например, связанному водородной связью RCOOH и RCOO^- .

Описанная выше схема в общих чертах является достаточно обоснованной, однако детали требуют дальнейшей разработки. В настоящее время не существует какой-либо общепринятой точки зрения на возможность существования симметричной водородной связи с одним минимумом потенциальной энергии где-либо, кроме иона бифторида. Не вызывает сомнений, что физические свойства сильных водородных связей качественно отличаются от свойств обычных слабых водородных связей и что протон не находится в течение измеримого отрезка времени вблизи одного из атомов, образующих водородную связь; спорным, однако, остается вопрос о том, делокализуется ли протон полностью по одной потенциальной яме или происходит чрезвычайно быстрый переход протона из одной потенциальной ямы в другую и обратно. Наиболее важные данные, необходимые для решения этих вопросов, были получены при помощи дифракции нейтронов и рентгеновских лучей и методами инфракрасной и видимой спектроскопии.

Очевидно, энергетический барьер для переноса протона вдоль асимметрической водородной связи должен быть мал. Так как скорость переноса протона от кислоты к основанию в процессе установления равновесия лимитируется диффузией, перемещение самого протона должно иметь свободную энергию активации, меньшую чем свободная энергия активации диффузии, что может быть следствием прохождения протона сквозь узкий энергетический барьер вследствие туннельного эффекта [43]. Более того, точный расчет поверхности потенциальной энергии для переноса протона от соляной кислоты к аммиаку указывает на отсутствие энергетического барьера для этой реакции [44].

Наиболее вероятно существование симметричной водородной связи с одной потенциальной ямой в ионе бифторида ($F - H - F$), где расстояние $F...F$ равно лишь 2,26 Å. Нормальная валентная частота связи $H - F$ исчезает в инфракрасном спектре соли, содержащей этот ион, и заменяется полосами поглощения при 1450 и 600 $см^{-1}$, которые можно приписать асимметричной и симметричной валентным частотам соответственно, и полосой при 1225 $см^{-1}$, относящейся к деформационному колебанию симметричной системы, в которой протон находится в единственной потенциальной яме посередине между атомами фтора; такая интерпретация подтверждается данными по теплоемкости и дифракции нейтронов для этого соединения [45].

Твердые комплексы с водородной связью типа кислых солей карбоновых кислот делят на два класса по ряду различных физических критериев. К первому классу относят комплексы, для которых при помощи инфракрасной спектроскопии, дифракции нейтронов и рентгеновских лучей показано, что карбоксильная группа и карбоксилат-ион сохраняют в общем каждый свою индивидуальность, хотя их структуры могут быть искажены водородной связью, и что протон находится вблизи одного из атомов, с которым он образует связь. Эти системы несомненно отвечают водородным связям с двумя потенциальными ямами, хотя точный вид потенциальных кривых остается спорным. Ко второму классу относят твердые комплексы, обладающие рядом свойств, характерных для симметричных систем с одной потенциальной ямой. Эксперименты по дифракции нейтронов на смешанных кристаллах фенилуксусной кислоты с ее натриевой солью при низкой температуре указывают на то, что, в пределах довольно высокого разрешения этого метода протон находится посередине между двумя атомами кислорода, являясь участником, по-видимому, симметричной водородной связи [46]. Рентгенографические исследования ряда систем этого типа, таких, как комплекс трифторуксусной кислоты с ее натриевой солью с расстоянием $O...O$, равным 2,435 Å, показывают, что две карбоксильные группы становятся эквивалентными и имеют длины связей, промежуточные между длинами связей в свободной и ионизированной карбоксильных группах. Это значит, что либо система является симметричной (VI), либо протон может перемещаться между двумя карбоксильными группами таким образом, что обе группы выглядят идентичными при рентгенографическом анализе.



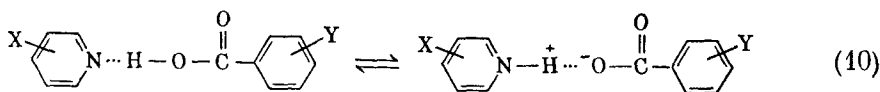
VI

Такие соединения можно противопоставить комплексам первого класса, например системе глиоксалева кислота — глиоксалат натрия с расстоянием $O...O$, равным 2,53 Å, в которой обе карбоксильные группы четко различаются [47].

В инфракрасных спектрах ряда кристаллических соединений второго класса, а также моноаниона малеата отсутствует поглощение в области, где обычно обнаруживают валентные колебания связи $O - H$, однако появляются широкие, интенсивные полосы поглощения около или ниже 1600 $см^{-1}$, так же как и в ионе бифторида. Это может соответствовать чрезвычайно сильному вытягиванию нормальной $O - H$ -связи или, что более вероятно, либо структуре $[O...H...O]^-$, в которой протон расположен вблизи центра связи, либо системе, в которой протон перемещается между двумя потенциальными ямами со скоростью, сравнимой с частотой валентного колебания $O - H$ -связи, так что такие колебания не могут осуществляться [48, 49]. В некоторых случаях характерные для карбоксильной группы и кар-

боксилат-иона полосы поглощения в инфракрасной области исчезают. Можно предположить, что при этом карбоксильная и карбоксилатная группы объединяются в одну частицу с полосой поглощения в промежуточном положении [50]. В растворе обычно находят отдельные полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп, т. е. водородная связь, очевидно, в этом случае несимметрична [20]; однако в некоторых случаях исчезновение или сдвиг к очень низким валентным частотам поглощения $A-H$ — связи происходит и в растворе [51—53].

Связь между кислотностью и основностью компонентов водородной связи и характером образованной связи становится ясной при рассмотрении ряда водородных связей между замещенными пиридинами и бензойными кислотами в твердом состоянии и в ацетонитрильном растворе [51]. В инфракрасных спектрах комплексов со слабыми кислотами присутствует полоса поглощения карбоксильной группы; с ростом кислотности карбоновой кислоты происходит скачкообразный переход к спектру карбоксилат-иона, при этом вид потенциальной кривой системы изменяется, так что более устойчивым становится расположение протона в потенциальной яме, соответствующей структуре пиридиний — карбоксилат [уравнение (10)]:

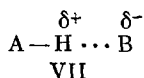


Таким образом, в большинстве комплексов, образованных водородной связью, протон расположен в одном из энергетических минимумов системы. При величинах ΔpK вблизи критического значения, при котором происходит изменение структуры, ни для $N-H$ — связи, ни для $O-H$ — связи в ряде комплексов не обнаруживаются характерные валентные полосы поглощения выше 1700 см^{-1} . Можно предположить, что протон при этом находится в единственной потенциальной яме или очень быстро переносится между двумя основаниями. Однако непрерывный переход через ряд промежуточных структур карбоксильной группы в этих комплексах, как можно было бы ожидать для истинной симметричной водородной связи, отсутствует.

В. МОДЕЛИ ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ

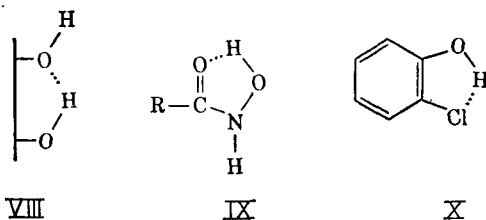
При рассмотрении природы сил, обеспечивающих устойчивость водородной связи, обычно различают «электростатическую» и «ковалентную» теории водородной связи [1]. Необходимо ясно осознавать, что нет четкого различия между этими приближениями; ковалентное связывание обусловлено электростатическими силами, и волновые уравнения, описывающие связь, не содержат отдельных членов для «электростатического» и «ковалентного» вкладов в связь. Тем не менее часто полезно различать эти вклады при описании водородной связи, поэтому рассмотрим здесь оба приближения.

В соответствии с электростатической моделью устойчивость водородной связи обусловлена энергетически благоприятным взаимодействием между частичным положительным зарядом протона и отрицательным зарядом атома акцептора или диполя



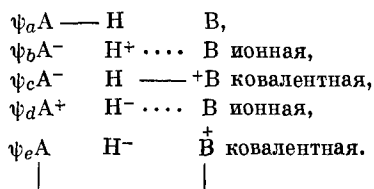
Этот тип взаимодействия, вероятно, играет большую роль в водородных связях с относительно большим расстоянием $A \cdots B$. Энергия для линейной водородной связи будет максимальной, но она не будет резко понижаться при умеренном изгибе связи, и в противоположность некоторым утверждениям существует целый ряд примеров устойчивых водородных связей в цик-

лических системах, где водородная связь определенно не линейна, например 5-членная кольцевая водородная связь в 1,2-диолах, гидроксамовых кислотах и 2-замещенных фенолах, таких, как галогензамещенные фенолы



Наиболее серьезные возражения против чисто электростатической модели водородной связи состоят в том, что, во-первых, эта модель не объясняет аномально большую интенсивность валентной частоты А — Н в водородной связи в инфракрасной области и, во-вторых, отсутствует строгая корреляция между дипольными моментами донорных молекул и прочностью образованных ими водородных связей. Так, триметиламин с дипольным моментом всего лишь 0,7 Д образует сильные водородные связи, в то время как ацетонитрил со значительно большим дипольным моментом 3,44 Д образует только очень слабые водородные связи [1,54]. Это привело к попыткам учесть «ковалентный» вклад в водородную связь либо в терминах теории резонанса, либо при помощи метода молекулярных орбиталей.

Согласно теории резонанса, водородную связь можно описать как результат наложения следующих резонансных структур:



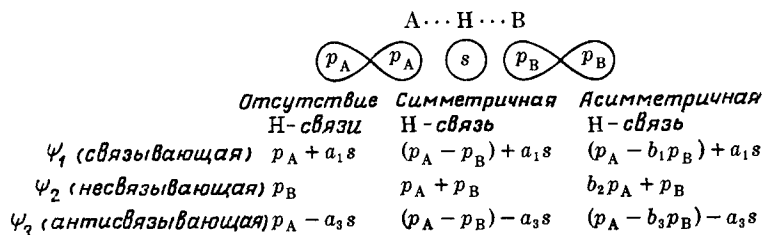
Волновая функция всей системы представляет собой линейную комбинацию волновых функций отдельных структур:

$$\Psi = a\psi_a + b\psi_b + c\psi_c + d\psi_d + e\psi_e. \quad (11)$$

В уравнении (11) коэффициенты $a, b, c, \dots$ отвечают вкладам каждой структуры в систему в целом. При теоретических вычислениях предполагают, что вклады ковалентных структур (особенно c , в которой осуществляется ковалентное взаимодействие между Н и В) существенны, хотя и не являются преобладающими для длинных водородных связей. При уменьшении расстояния А...В их вклад в устойчивость связи увеличивается [55]. Однако вычисления такого типа весьма неточны даже для простых систем [56].

Альтернативное описание ковалентного вклада в водородную связь, основанное на методе молекулярных орбиталей, по мнению автора, более удовлетворительно. Одна из проблем водородной связи заключается в том, что для ее образования необходимо, чтобы атом водорода, обладающий единственной 1s-орбиталью, способной к образованию связи, взаимодействовал с двумя атомами. В резонансной модели это объяснялось «несвязывающим» резонансом между структурами a , c и e . Метод молекулярных орбиталей дает вполне обоснованное объяснение связывания атома водорода, которое по существу эквивалентно объяснению образования донорно-акцепторных (с переносом заряда) комплексов и пятивалентного переходного состояния в S_N2 -замещении при атоме углерода без привлечения орбиталей с высокой энергией [4]. В соответствии с этой моделью молекулярные орби-

тали системы строятся из имеющихся атомных орбиталей: двух орбиталей (обычно p -орбиталей), каждая из которых содержит неподеленную электронную пару в изолированных частицах A^- и B , и $1s$ -орбитали атома водорода. Они могут объединяться, образуя три молекулярные орбитали: связывающую орбиталь ψ_1 , несвязывающую орбиталь ψ_2 и антисвязывающую орбиталь ψ_3 , как это показано ниже:



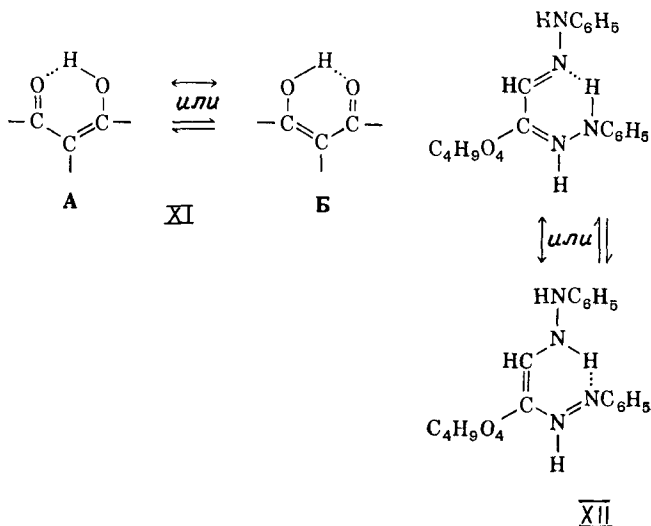
В исходном состоянии, когда молекулы $A - H$ и B не образуют водородной связи, связывающая молекулярная орбиталь $A - H$ -связи образована p -орбиталью A и s -орбиталью H и содержит одну электронную пару. Другая электронная пара находится на p -орбитали молекулы B и не участвует в образовании связи (неподеленная пара). Коэффициенты a и b в этих выражениях описывают величину вклада каждой атомной орбитали в молекулярную орбиталь. Теперь, если $A - H$ и B сближаются с образованием симметричной водородной связи, связывающая орбиталь, включающая все три атома, может быть построена из двух p - и одной s -орбиталей и будет содержать одну электронную пару. (Знаки в этих выражениях отвечают симметрии системы, а не величине вклада каждой орбитали.) Вторая электронная пара будет находиться на несвязывающей орбитали, которая образована p -орбиталями A и B и вообще не включает атома водорода. Будет также существовать антисвязывающая орбиталь, образованная всеми тремя атомными орбиталями, которая не будет занята.

В асимметричной водородной связи по существу все будет так же, за исключением того, что вклады различных орбиталей будут несимметричны, что показано коэффициентами a и b .

Очень важно в этой модели то, что она позволяет построить трехатомную двухэлектронную связь, обеспечивающую устойчивость системы без нарушения запрета Паули. По сравнению с обычной двухатомной двухэлектронной связью такая связь будет обладать некоторым дефицитом электронов, и можно ожидать, что в ней расстояние $A - H$ будет увеличено по сравнению с обычной ковалентной $A - H$ -связью. Электроны, находящиеся на несвязывающей орбитали, построенной из p -орбиталей A и B , будут локализованы на A и B , так что устойчивость системы будет возрастать по мере роста электроотрицательности A и B , т. е. с ростом их способности удерживать электроны.

Для коротких, исключительно прочных водородных связей ковалентный вклад должен быть особенно велик. Он будет давать максимальную энергию стабилизации связи, когда она линейна, и эта стабилизация не будет полностью исчезать при небольших изгибах связи.

Часто предполагают, что системы с циклическими водородными связями, для которых можно изобразить соответствующие резонансные структуры, например енолы β -дикетоннов (XI) и озоны сахаров (XII), обладают некоторым «ароматическим» характером. Однако в некоторых системах, которые можно представить в таких резонансных структурах, как основания Шиффа, пиридоксальфосфат и подобные соединения (гл. 2, разд. Д,5), наличие двух различных ультрафиолетовых спектров поглощения, соответствующих каждому из двух таутомеров, свидетельствует о том, что этот резонанс отсутствует и протон расположен асимметрично около



одного из двух основных атомов, с которым он связан. В спектрах ядерного магнитного резонанса соединений этого типа, как правило, обнаруживают одну полосу поглощения, однако этого и следовало ожидать независимо от того, имеет или нет соединение ароматический характер, так как внутримолекулярный перенос протона, как правило, происходит быстро и в пределах разрешающей способности спектроскопии ЯМР наблюдается единичный сигнал протона для равновесной смеси таутомеров. Положение максимума в ультрафиолетовых спектрах поглощения енолизированных β -дикетонов можно рассматривать как доказательство существования асимметричной водородной связи, и некоторые из этих енолов обнаруживают две полосы поглощения в инфракрасной области, которые можно отнести к карбонильным валентным колебаниям в двух таутомерах ХІА и ХІБ. Однако другие соединения этого типа обнаруживают только одну интенсивную широкую полосу поглощения в инфракрасной области (около 1600 см^{-1}), которая имеет частоту, значительно меньшую, чем частота нормальной карбонильной связи, и не обнаруживают поглощения $\text{O} - \text{H}$ -связи в характерной для нее области. Исходя из этого можно предположить, что карбонильная связь в этих соединениях в значительной степени носит характер одинарной связи и что взаимное превращение форм ХІА и ХІБ может происходить намного быстрее, чем колебания самих групп, т. е. соединения могут существовать в виде единого резонансного гибрида с прочной водородной связью [57]. Действительно, если считать справедливыми доказательства существования симметричных водородных связей и либо резонансную, либо молекулярно-орбитальную модель ковалентного характера связи между водородом и двумя соседними атомами, то, по-видимому, можно принять, что благодаря ковалентному взаимодействию атома водорода с обоими, образующими водородную связь атомами может возникнуть участок циклической системы со свойствами, обычно приписываемыми ароматическим молекулам. Для окончательного решения этого интересного вопроса необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пиментел Д. К., Мак-Клелан А. Л., Водородная связь, «Мир», М., 1964.
2. Zachau H. G., Karau W., Ber., 93, 1830 (1960).
3. Berg P., Bergmann F. H., Ofengand E. J., Dieckmann M., J. Biol. Chem., 236, 1726 (1961); Jencks W. P., Cordes S., Carriuolo J., ibid., 235, 3608 (1960).
4. Bruce T. C., Fife T. H., J. Am. Chem. Soc., 84, 1973 (1962).

5. Harrell S. A., McDaniel D. H., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4497 (1964).
6. Haque R., Reeves L. W., J. Am. Chem. Soc., **89**, 250 (1967); Schaumberg K., Deverell C., *ibid.*, **90**, 2495 (1968).
7. Broene H. H., De Vries T., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1644 (1947).
8. Selvaratnam M., Spiro M., Trans. Faraday Soc., **61**, 360 (1965); Pethybridge A. D., Prue J. E., *ibid.*, **63**, 2019 (1967).
9. Martin D. L., Rossotti F. J. C., Proc. Chem. Soc. **1959**, 60.
10. Danielsson I., Suominen T., Acta Chem. Scand., **17**, 979 (1963); Farrer H. N., Rossotti F. J. C. *ibid.*, p. 1824.
11. Schrier E. E., Pottle M., Scheraga H. A., J. Am. Chem. Soc., **86**, 3444 (1964).
12. Kirkwood J. G., Westheimer F. H., J. Chem. Phys., **6**, 506, (1938); Westheimer F. H., Kirkwood J. G., *ibid.*, p. 513.
13. Tanford C., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5348 (1957).
14. Westheimer F. H., Shookhoff M. W., J. Am. Chem. Soc., **61**, 555 (1939).
15. Dodd R. E., Miller R. E., Wynne-Jones W. F. K., J. Chem. Soc., **1961**, 2790.
16. Glasoe P. K., Ebersson L., J. Phys. Chem., **68**, 1560 (1964).
17. Westheimer F. H., Benfey O. T., J. Am. Chem. Soc., **78**, 5309 (1956).
18. Silver B. L., Luz Z., Peller S., Reuben J., J. Phys. Chem., **70**, 1435 (1966).
19. Ebersson L., Acta Chem. Scand., **13**, 224 (1959).
20. Chapman D., Lloyd D. R., Prince R. H., J. Chem. Soc., **1964**, 550.
21. Eigen M., Kruse W., Z. Naturforsch., **18b**, 857 (1963).
22. Haslam J. L., Eyring E. M., Epstein W. W., Jensen R. P., Jaget C. W., J. Am. Chem. Soc., **87**, 4247 (1965).
23. Lamola A. A., Sharp L. J., J. Phys. Chem., **70**, 2634 (1966).
24. Klotz I. M., Franzen J. S., J. Am. Chem. Soc., **84**, 3461 (1962).
25. Schellman J. A., Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, **29**, 223 (1955).
26. Susi H., Timasheff S. N., Ard J. S., J. Biol. Chem., **239**, 3051 (1964).
27. Mirsky A. E., Pauling L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **22**, 439 (1936).
28. Kauzmann W., Advan. Protein. Chem., **14**, 1, (1959).
29. Wetlaufer D. B., Malik S. K., Stoller L., Coffin R. L., J. Am. Chem. Soc., **86**, 508 (1964); Whitney P. L., Tanford C., J. Biol. Chem., **237**, PC 1735 (1962).
30. Nozaki Y., Tanford C., J. Biol. Chem., **238**, 4074 (1963).
31. Greenstein J. P., J. Biol. Chem., **125**, 501 (1938); **128**, 233 (1939); Greenstein J. P., Edsall J., *ibid.*, **133**, 397 (1940).
32. Gordon J. A., Jenks W. P., Biochemistry, **2**, 47 (1963).
33. Robinson D. R., Jenks W. P., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2462 (1965).
34. Karush F., Advan. Immunol., **2**, 1 (1962).
35. Rupley J. A., Butler L., Gerring M., Hartdegen F. J., Pecoraro R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **57**, 1088 (1957).
36. Green N. M., Biochem. J., **89**, 599 (1963).
37. Gordy W., Stanford S. C., J. Chem. Phys., **9**, 204 (1961).
38. Arnett E. M., Progr. Phys. Org. Chem., **1**, 223 (1963).
39. Tamres M., Searles S., Leighly E. M., Mohrman D. W., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3983 (1954).
40. Epley T. D., Drago R. S., J. Am. Chem. Soc., **89**, 5770 (1967).
41. Rubin J., Panson G. S., J. Phys. Chem., **69**, 3089 (1965); Rubin J., Senkowski B. Z., Panson G. S., *ibid.*, **68**, 1601 (1964).
42. Drago R. S., Wayland B. B., J. Am. Chem. Soc., **87**, 3571 (1965).
43. Eigen M., Angew. Chem. Intern. Ed., **3**, 1 (1964); Grunwald E., Progr. Phys. Org. Chem., **3**, 317 (1965).
44. Clementi E., J. Chem. Phys., **46**, 3851 (1967).
45. Pitzer K. S., Westrum E. F., J. Chem. Phys., **15**, 526 (1947); McGaw B. L., Ibers J. A., *ibid.*, **39**, 2677 (1963); Coté G. L., Thompson H. W., Proc. Roy. Soc. (London), **210A**, 206 (1951); Ibers J. A., J. Chem. Phys., **41**, 25 (1964).
46. Bacon G. E., Curry N. A., Acta Cryst., **10**, 524 (1957); **13**, 717 (1960).
47. Colić L., Speakman J. C., J. Chem. Soc., **1965**, 2521, 2530; Shrivastava H. N., Speakman J. C., *ibid.*, **1961**, 1151; Speakman J. C., Mills H. H., *ibid.*, p. 1164.
48. Blinc R., Hadži D., Novak A., Z. Elektrochem., **64**, 567 (1960); Blinc R., Hadži D., Spectrochim. Acta, **16**, 853 (1960).
49. Cardwell H. M. E., Dunitz J. D., Orgel L. E., J. Chem. Soc., **1953**, 3740.
50. Hadži D., Marciszewski H., Chem. Commun., **1967**, 2.
51. Jonson S. L., Rumon K. A., J. Phys. Chem., **69**, 74 (1965).
52. Hadži D., Kobilarov N., J. Chem. Soc., **1966 A**, 439.
53. Williams J. M., Kreevoy M., J. Am. Chem. Soc., **89**, 5499 (1967).
54. Coulson C. A., Research (London), **10**, 149 (1957).
55. Coulson C. A., Danielsson U., Arkiv Fysik, **8**, 239 (1954); Tsubomura H., Bull. Chem. Soc. Japan, **27**, 445 (1954).
56. Bowen H. C., Linnett J. W., J. Chem. Soc., **1966A**, 1675.
57. Cambell R. D., Gilow H. M., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5426 (1960); Forsén S., Acta Chem. Scand., **18**, 1208 (1964); Barnum D. W., J. Inorg. Nuc. Chem., **21**, 221 (1961).

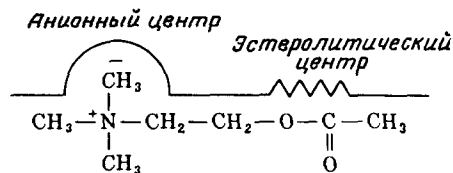
ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Взаимодействия между заряженными группами, безусловно, вносят вклад в *специфичность* фермент-субстратного взаимодействия. Однако, в какой степени электростатическое притяжение в состоянии обеспечить *движущую силу* межмолекулярных взаимодействий в водном растворе, еще не вполне ясно. Также недостаточно полно разработаны теоретические основы ионных взаимодействий в водных растворах. Существует обширная литература по теории ионных взаимодействий, однако при отсутствии детальных сведений о структуре воды и о природе микроскопических взаимодействий ион-вода и ион-ион в воде существующие теории не дают в общем случае возможности количественно описать их. В этой главе будет рассмотрен эмпирический подход, основанный на описании различных проявлений этих взаимодействий. Будут также сделаны, в основе своей феноменологические, попытки их корреляции и объяснения. Читатель может ознакомиться более подробно с теоретическими и экспериментальными основами проблемы электростатических взаимодействий в воде по другим источникам [1].

А. МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

1. СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ

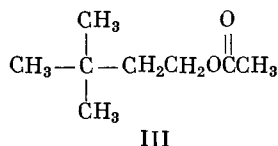
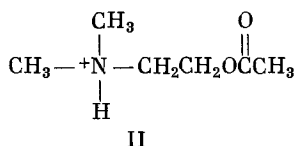
Типичным примером проявления электростатических сил в фермент-субстратных взаимодействиях может служить связывание положительно заряженной группы ацетилхолина и подобных ему субстратов и ингибиторов с анионным центром фермента ацетилхолинэстеразы (I) [2].



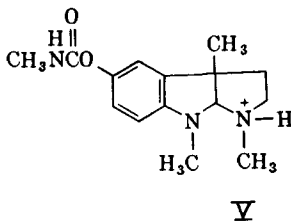
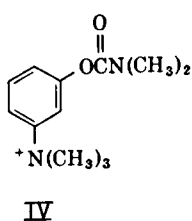
I

Субстрат диметиламиноэтилацетат (II) подобен ацетилхолину, за исключением того, что одна метильная группа замещена в нем на способный к диссоциации атом водорода, так что при высоких значениях pH субстрат переходит в незаряженную форму свободного амина. Активность фермента к этому субстрату при возрастании pH и потере им положительного заряда уменьшается в три раза по сравнению с ацетилхолином. Аналогично константа Михаэлиса для незаряженного субстрата изоамилацетата (III) в во-

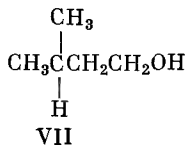
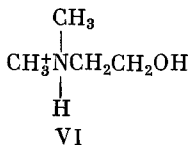
семь раз больше, чем для протонированного диметиламиноэтилацетата



Для установления того, чем вызваны эти различия — изменением в связывании или в скоростях ацилирования фермента субстратом, — необходимо детальное кинетическое исследование, однако, во всяком случае, очевидно, что присутствие положительного заряда усиливает фермент-субстратное взаимодействие в небольшой, но вполне ощутимой степени. Аналогично ингибирование ацетилхолинэстеразы соединением с четвертичной аммониевой группой неостигмином (IV) не зависит от значения pH, в то время как ингибирование третичным амином физостигмином (V) уменьшается в 16 раз при потере положительного заряда.



Катионный ингибитор диметиламиноэтанол (VI) связывается с ферментом в 30 раз сильнее, чем незаряженный ингибитор изоамиловый спирт (VII).



Таким образом вклад электростатических сил в энергию взаимодействия четвертичного аммониевого иона, заряд в котором довольно хорошо экранирован, с анионным центром этого фермента имеет порядок 1—2 ккал/моль ($\Delta F = -RT \ln 30$). В дальнейшем будет видно, что даже такая сравнительно малая энергия вряд ли обеспечивается простым электростатическим притяжением, так как для тетраалкиламмониевых ионов в воде наблюдают очень малые энергии электростатического взаимодействия. Связывание может вызываться силами, отличающимися от простого электростатического взаимодействия, а отрицательный заряд в связывающем центре фермента может служить только для правильной ориентации субстрата на активном центре и обеспечивать специфичность, так как связывание нейтральных и анионных субстратов энергетически становится менее выгодным. Из pH-зависимости ингибирования катионами алкиламмония следует, что в анионный центр фермента входит карбоксильная группа [3].

Взаимодействия *моноанионов* с ферментами и другими белками часто происходят с намного большими энергиями связывания [4—8]. Ингибирующая способность анионов по отношению к ацетоацетатдекарбоксилазе убывает в следующем ряду: $\text{SCN}^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{BrO}_3^- > \text{F}^- \sim \text{IO}_3^-$ (ионы HSO_3^- и Cl_3CCOO^- , по-видимому, оказывают специфическое влияние на этот фермент и поэтому исключены из списка). Значения констант диссоциации комплексов с этими ионами лежат в пределах $1,1 \cdot 10^{-4} \dots 0,1$ моль/л, что соответствует свободным энергиям связывания от -1 до -5

Таблица 1

Взаимодействие анионов с белками, анионообменной смолой
и этиловым эфиром ацетилтетраглицина (ЭАТГ).
Анионы приведены в порядке уменьшения силы взаимодействия

Концентрация 50%-ного ингибирования ацетоаце- татдекарбоксилазы ^а , моль/л		Сродство к шерсти при 0 °С, log K ^б	Сродство к смоле дауэкс 2, K ^в	Изменение температуры плавления 5%-ного геля желатины в присутствии 1 моль/л соли, °С ^г	Взаимодей- ствие с ЭАТГ, k _S ^д
Пикрат		3,86	—	—	
ClO ₄ ⁻	0,0007	—	32	—	—0,33
SCN ⁻	0,001	—	19	—14,4	—0,25
Cl ₃ CCOO ⁻	0,33	1,46	18	—17,7	—0,27
n-Тозилат	—	1,04	14	—14,9 ^е	—0,31
I ⁻	0,001	—	8—13	—14,4	—0,23
Br ⁻	0,01	0,69	3,4	—7,6	0
NO ₃ ⁻	0,013	0,89	3,3	—8,1	—0,08
Cl ⁻	0,05	0,43	1,0	—2,4	0,05
BrO ₃ ⁻	0,076	—	1,0	—	0,09
H ₂ PO ₄ ⁻		0,12	0,34	—	0,36
CH ₃ COO ⁻		—	0,17	—	0,23
F ⁻	0,10	—	0,10	+4,1	0,23 ^ж

^а См. [4].

^б Константы связывания для шерсти в кислом растворе [5].

^в Сродство по отношению к Cl⁻ [6].

^г Натриевые соли [7]. Температура плавления в воде 30,4 °С.

^д Константа высаливания для натриевых солей [8].

^е Бензолсульфонат.

^ж Калиевая соль.

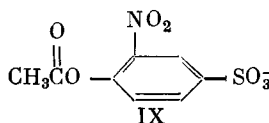
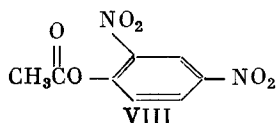
ккал/моль (от —4,2 до —21·10³ Дж/моль) [табл. 1]. Интересно, что термодинамические параметры связывания этих ионов изменяются в чрезвычайно широких пределах: ΔH изменяется от —28 ккал/моль (—127·10³ Дж/моль) для SCN⁻ до +1 ккал/моль (4,18·10³ Дж/моль) для IO₃⁻, а ΔS — от —74 энтр. ед. (—311 Дж/моль·К) для SCN⁻ до +8 энтр. ед. (33,6 Дж/моль·К) для IO₃⁻. Таким образом, наблюдаемое сравнительно небольшое изменение свободной энергии связывания является результатом почти полной компенсации namного больших изменений энтальпии и энтропии. Это может служить еще одним примером того, как большие изменения в энтальпии и энтропии, которых следует ожидать для прямого взаимодействия, могут взаимно компенсироваться и приводить к относительно малым изменениям свободной энергии. Большие изменения энтропии, по-видимому, отражают изменения в структуре растворителя и белка, которые происходят таким образом, что компенсируют энтальпийные изменения. Так, энтропийно неблагоприятное увеличение структурированности воды может сопровождаться энергетически благоприятным образованием водородных связей, так что свободная энергия изменяется лишь незначительно.

Подобным же образом располагаются анионы по эффективности связывания с другими белками, такими, как шерсть или бычий сывороточный альбумин, и с анионообменными смолами, такими, как тетраэтиламмониевая смола дауэкс 2 (табл. 1). Связывание может быть очень сильным: константы связывания ионов хлорида, тиоцианата и трихлорацетата с высокоэффективным центром бычьего сывороточного меркаптоальбумина равны 2400; 24 000 и 120 000 л/моль соответственно, что дает в свободных энергиях связывания величины от —5 до —7 ккал/моль [9].

Для приведенного выше ряда очень характерна взаимосвязь между эффективностью связывания и размером и плотностью заряда иона, особенно в ряду галогенидов. В ряду $I^- > Br^- > Cl^-$ порядок изменения эффективности связывания *противоположен* тому, который следовало бы ожидать в случае чисто электростатического характера связывания аниона с катионным центром. В общем линейной зависимости между прочностью связи и размером иона нет, так как многие большие анионы, такие, как фосфат и ацетат, связываются очень слабо.

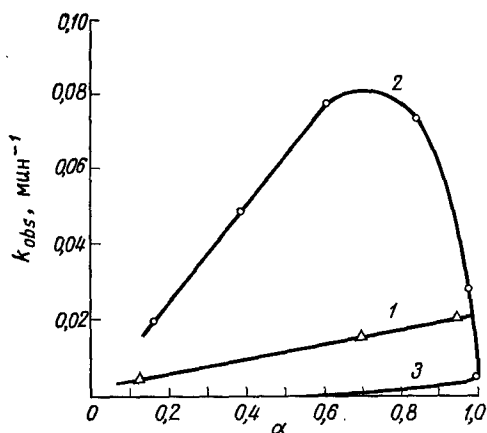
Непосредственной мерой силы межионных взаимодействий могли бы быть константы равновесия образования ионных пар в водном растворе, однако для одновалентных ионов такие пары чрезвычайно неустойчивы. Измерение констант равновесия при слабой ассоциации связано с большими экспериментальными трудностями, но, по-видимому, можно считать, что константы ассоциации образования ионных пар из обычных одновалентных ионов не превышают 1,0 л/моль и близки к значению, которое следовало бы ожидать для механизма случайных столкновений сольватированных ионов [10]. Даже если один из ионов является двухвалентным, константа ассоциации остается незначительной, однако, если оба иона двухвалентны, наблюдаются большие значения констант. Характерными величинами являются: 9 л/моль для $K^+ \cdot SO_4^{2-}$, 5 л/моль для $Na^+ \cdot SO_4^{2-}$, 190 л/моль для $Ca^{2+} \cdot SO_4^{2-}$ и 140 л/моль для $Mg^{2+} \cdot SO_4^{2-}$ [11].

Взаимодействие зарядов слабо влияет на скорости нуклеофильных реакций монокатионов диаминов с дианионом *n*-нитрофенилфосфата (гл. 5, разд. Г.5), и вообще изменения скоростей других реакций под влиянием таких взаимодействий обычно не превышают одного порядка. Более значительные электростатические эффекты наблюдаются, если один из реагентов — полиэлектролит, как, например, в случае реакций частично протонированных поливинилпиридина и поливинилимидазолов с анионными субстратами [12,13]. Поли-(4)-винилпиридин является несколько менее эффективным катализатором (по активности на одну пиридиновую группу) для гидролиза нейтрального субстрата 2,4-динитрофенилацетата (VIII), чем низкомолекулярный аналог 4-метилпиридин, по-видимому, вследствие меньшей доступности атомов азота пиридина в полимере. Однако по отношению к анионному субстрату 3-нитро-4-ацетоксибензосульфонату (IX) полимер намного более реакционноспособен, чем мономер



Максимальная скорость реакции достигается при промежуточной степени ионизации, когда пиридиновые остатки находятся частично в виде свободного основания, частично в катионной форме (рис. 1, кривая 2). Сравнение максимальной скорости этой реакции и скорости, ожидаемой при том же значении pH для реакции с незаряженным субстратом, имеющим такую же реакционную способность (эта скорость, вычисленная на основании скорости реакции с незаряженным полимером при высоком значении pH и pH-зависимости для реакции полимера с 2,4-динитрофенилацетатом, приведена на рис. 1, кривая 3), показывает, что происходит 80-кратное ускорение, которое можно приписать электростатическому взаимодействию катионного полимера с анионным субстратом. Это взаимодействие, по-видимому, приводит к связыванию субстрата и возрастанию его эффективной концентрации в области активных пиридиновых групп. Максимальной активностью обладает, естественно, частично нейтрализованный полимер, так как необходимо наличие как катионных групп для связывания, так и нейтральных для осуществления нуклеофильной атаки на субстрат [12].

Электростатический эффект может привести к большим ускорениям в разбавленном растворе, если и *субстрат*, и *катализатор* являются электролитами. Так, скорость гидролиза крахмала, содержащего протонированные диэтиламиноэтиловые группы, в присутствии полистиролсульфоновой кислоты в 500 раз больше, чем в растворе хлористоводородной кислоты той же кислотности. Механизм ускорения приводит к некоторой специфичности: продукты гидролиза под действием полимерного катализатора содержат большие олигосахариды, чем те, которые образуются в реакции, катализируемой минеральной кислотой, причем размеры их возрастают с понижением степени замещения амина в субстрате [14]. Электростатические эффекты могут также вызывать ускорения реакций, протекающих на поверхности заряженных мицелл; несколько таких примеров приведено в гл. 8.



Р и с. 1. Каталитическая активность поли-4-винилпиридина в гидролизе 3-нитро-4-ацетоксибензолсульфоната (IX) [12].

1 — 0,016 моль/л 4-метилпиридина; 2 — поли-4-винилпиридин, содержащий 0,01 моль/л пиридина; 3 — кривая для реакции с полимером, вычисленная на основании pH-зависимости для реакции с динитрофенилацетатом (VIII).

Влияние солей на скорости реакций между заряженными реагентами при низких концентрациях солей обычно можно адекватно описать на основании теории Дебая — Хюккеля. Однако при больших концентрациях солей

вызываемые солью эффекты часто в большей степени зависят от природы используемой соли, чем от ионной силы раствора. Эти специфические солевые эффекты, по-видимому, являются результатом прямого взаимодействия противоионов с заряженными реагентами, переходными состояниями или и тем и другим и могут быть описаны таким же образом, как и другие прямые ионные взаимодействия [15].

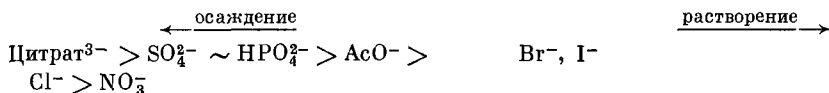
2. КОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ СОЛЕЙ

Описанные выше взаимодействия между ионами происходили в относительно разбавленных растворах, как правило, при концентрациях меньших 0,1 моль/л. Совершенно иные, но все же в некоторой степени коррелирующие с ними закономерности солевых эффектов наблюдаются как для нейтральных, так и для заряженных молекул в более концентрированных растворах солей порядка 1 моль/л. При наличии нескольких неизбежных исключений и граничных случаев соли можно разделить на два класса по влиянию их концентрированных растворов на белки, причем внутри каждого класса имеется свой характерный порядок изменения эффективности (табл. 2). Соли, содержащие ионы фосфата, сульфата, цитрата, ацетата или фторида, осаждают белки и предохраняют их от денатурации и диссоциации, в то же время соли, содержащие ионы тиоцианата, иодида, перхлората, лития, кальция или бария, способствуют растворению, денатурации и диссоциации белков [8, 16]. Введение ароматической группы, особенно нитрозамещенной, приводит к усилению свойств соли, характерных для второго класса. Расположение солей по эффективности их воздействия на белок в этих процессах совпадает с рядом Гофмейстера, или лиотропным рядом, который вначале был основан на относительной эффективности различных солей в осаждении белков и наблюдается в различных процессах, происходящих в водных раст-

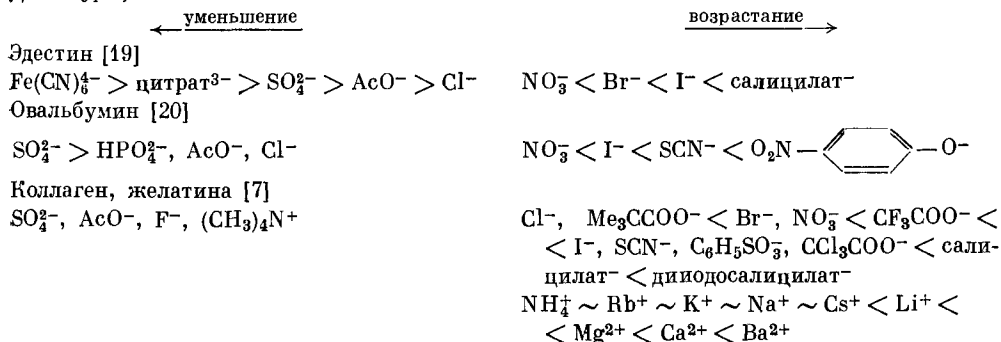
Таблица 2

Влияние концентрированных растворов солей на белки

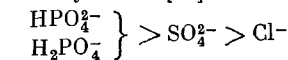
Растворимость [17]



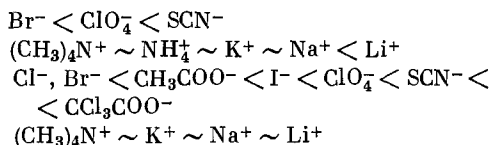
Денатурация



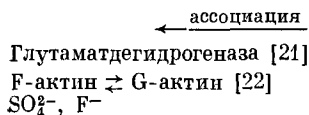
Рибонуклеаза [16]



ДНК [24]



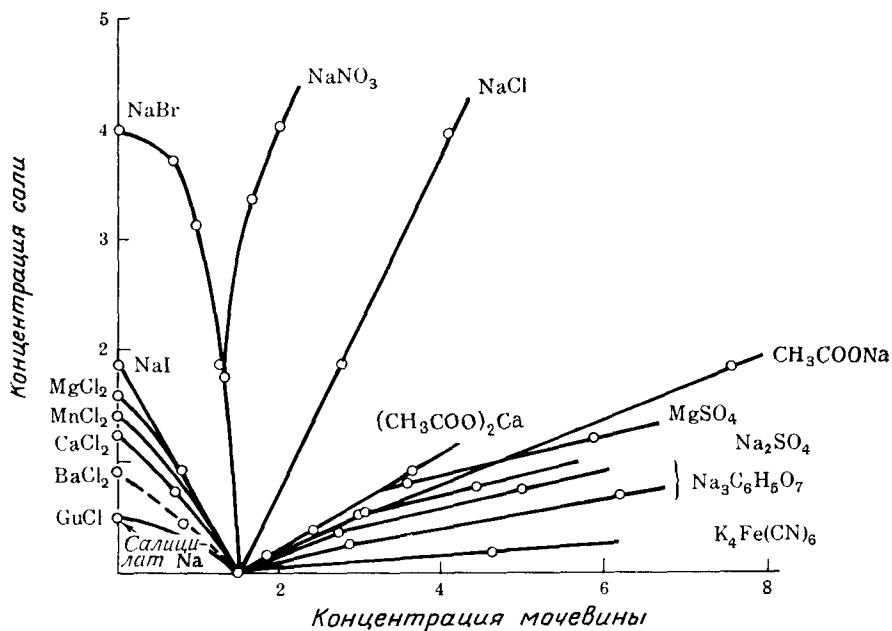
Агрегация и полимеризация



ворах солей [17, 18]. Для анионов этот ряд по существу такой же, как и в случае связывания с белками и ионообменными смолами в разбавленных растворах. Таким образом, существует определенное соответствие между эффектами, наблюдаемыми в концентрированных и разбавленных растворах солей.

Влияние солей на денатурацию белков иллюстрируется рис. 2, где показана концентрация мочевины, необходимая для того, чтобы вызвать денатурацию эдестина в присутствии различных солей. Соли, которые эффективно высаливают белки, такие, как цитраты, сульфаты, ацетаты и хлориды, предохраняют от денатурации мочевиной, в то же время соли, способствующие растворению белков, такие, как иодид натрия, хлорид бария, гидрохлорид гуанидина и салицилат натрия, усиливают денатурацию мочевиной и при более высоких концентрациях сами являются эффективными денатурирующими агентами [19]. В более поздних исследованиях было установлено, что соли по эффективности располагаются совершенно аналогичным образом при влиянии их на температуру плавления желатинового геля (табл. 1) и на денатурацию ряда других белков [16, 20], при ингибировании ряда ферментов (по-видимому, вследствие нарушения их третичной структуры [23]) и даже при денатурации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

[24]. Можно предположить на основании некоторых имеющихся в настоящее время данных, что аналогичный ряд существует и при вызываемой солями диссоциации белковых агрегатов [21, 22]. Деполимеризация F-актина



Р и с. 2. Влияние солей на концентрацию мочевины, необходимую для денатурации эдестина, измеряемой по освобождению сульфгидрильных групп [19].

до G-актина вызывается солями, приводящими при высоких концентрациях к денатурации белков, и ингибируется анионами сульфата и фторида [22]. Все эти изменения в физическом состоянии белков сопровождаются изменениями

в степени доступности белка для растворителя. Денатурация обычно заключается в разворачивании белковой глобулы, так что группы, находившиеся внутри ее в нативном белке, становятся доступными для растворителя (рис. 3). Участки поверхности белковых мономеров или субъединиц должны становиться менее доступными для растворителя при агрегации или осаждении. Таким образом, растворы солей, с которыми внутренние (для денатурации) или внешние (для агрегации или осаждения) участки могут энергетически благоприятно взаимодействовать, будут способствовать увеличению доступности этих участков для растворителя. Формально денатурационное равновесие можно описать при помощи уравнения

$$K = \frac{a_D}{a_N} = \frac{C_D f_D}{C_N f_N} \quad (1)$$

Р и с. 3. Схема равновесия между нативным глобулярным белком в водном растворе и двумя его разными денатурированными формами. Показано увеличение при денатурации степени доступности для растворителя групп, которые защищены от него в нативном белке [8].

в котором C , a и f — концентрация, активность и коэффициент активности соответственно, а индексы D и N относятся к денатурированному и нативному белку соответственно. Если принять коэффициенты активности в раз-

бавленном водном растворе равными 1,0, то возрастание отношения концентраций денатурированного и нативного белка может происходить или из-за увеличения коэффициента активности нативного белка, или, как это обычно происходит, вследствие уменьшения коэффициента активности денатурированного белка. Так как поверхность белковой глобулы доступна для растворителя как в нативном, так и в денатурированном состоянии, денатурация должна, следовательно, приводить к понижению коэффициентов активности внутренних боковых групп белка, которые становятся доступными для растворителя. Диссоциацию и растворение белков можно рассматривать таким же образом, относя коэффициенты активности к поверхностным участкам, доступность которых для растворителя меняется в этих процессах. В случае осаждения, однако, имеется осложняющий фактор, состоящий в том, что состав твердой фазы может не быть постоянным. Так, осаждение трихлорацетатом и перхлоратом в кислом растворе, вероятно, сопровождается связыванием этих анионов катионными белками, что приводит к уменьшению заряда белка и в результате этого к осаждению его в виде комплекса с солью. До тех пор, пока состав обеих фаз остается постоянным, объяснение вызываемых солью процессов денатурации, осаждения и агрегации сводится к определению, у каких боковых групп изменяются коэффициенты активности (или растворимость) в присутствии данной соли.

Осаждение белков в концентрированных растворах солей представляет собой довольно сложный специфический случай общего явления высаливания, по которому имеется большое число экспериментальных данных, главным образом измерений растворимости [25]. Так как активность чистой твердой или жидкой фазы постоянна, активность того же вещества в насыщенном растворе, находящемся в равновесии с твердым веществом или жидкостью, должна также оставаться постоянной, и любые изменения в концентрации насыщенного раствора, т. е. растворимости, которые происходят при изменении природы растворителя, могут быть описаны как изменения коэффициента активности растворенного вещества согласно уравнению

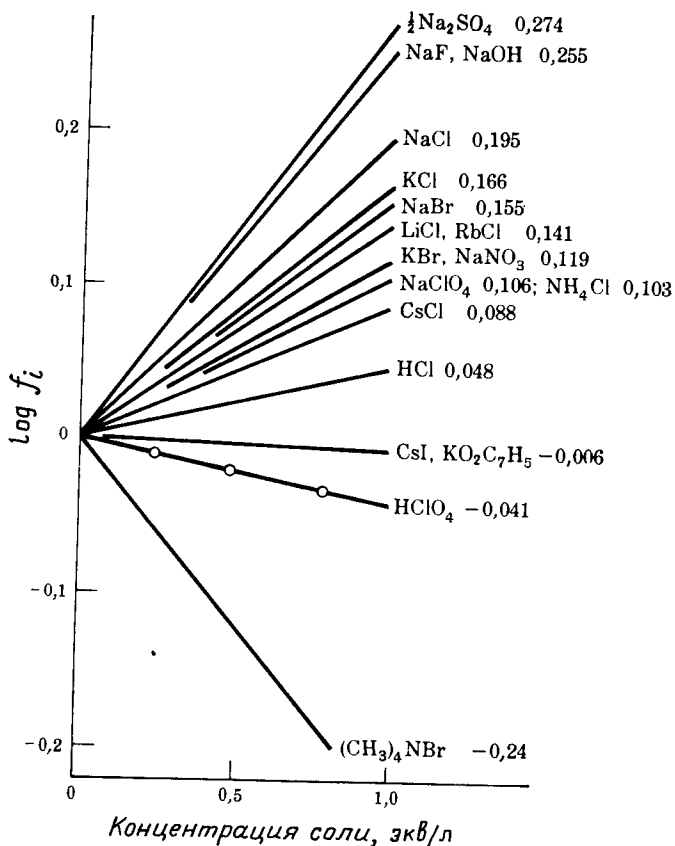
$$a(\text{тв}) = a(\text{раств}) = f(\text{раств}) C(\text{раств}) = \text{const.} \quad (2)$$

На рис. 4 представлен логарифм коэффициента активности бензола как функция концентрации ряда солей. Экспериментально найдено, что для многих солей логарифмы растворимости и коэффициентов активности растворяемого вещества линейно зависят от концентрации соли, т. е. линейно изменяется свободная энергия растворения. Это соотношение выражается уравнением Сеченова:

$$\log \frac{S_0}{S} = \log \frac{f}{f_0} = k_s C_{\text{salt}}, \quad (3)$$

в котором S_0 и f_0 — растворимость и коэффициент активности соответственно в воде, а k_s — константа высаливания, которая является мерой чувствительности растворенного вещества к данной соли. k_s имеет положительный знак, когда коэффициент активности возрастает, а растворимость уменьшается, и отрицательный знак, когда коэффициент активности уменьшается, а растворимость возрастает в присутствии соли. Примечательно, что это уравнение часто выполняется до концентраций солей порядка 1 моль/л и более, несмотря на сложность поведения концентрированных растворов солей с теоретической точки зрения, и что это же соотношение точно выполняется даже для таких сложных систем, как растворы белков [26]. Простые неполярные вещества, такие, как бензол, высаливаются почти всеми солями, причем порядок изменения эффективности солей приблизительно совпадает с рядом Гофмейстера, однако некоторые соли, такие, как бромистый тетраметиламмоний, всаливают бензол (рис. 4).

При увеличении размеров молекул растворенного вещества величина k_s возрастает. При возрастании полярности веществ величины k_s , как правило, сдвигаются в отрицательном направлении, т. е. вверх прямых на рис. 4



Р и с. 4. Влияние солей на коэффициент активности бензола при 25 °C [25]. Цифрами обозначены величины k_s [уравнение (3)].

поворачивается вниз. Если растворенное вещество содержит кислотные или основные группы, которые могут специфически взаимодействовать с некоторыми солями, характерный ряд эффективности солей может нарушаться [25].

Б. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

1. ПРЯМЫЕ ИОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

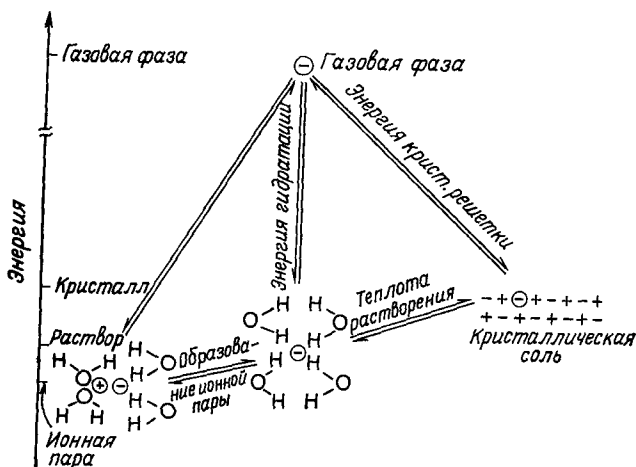
На первый взгляд эффективность электростатических взаимодействий не подчиняется никакой разумной с точки зрения простой электростатической теории закономерности. В общем сила электростатического взаимодействия либо слабо зависит от размеров ионов, либо оказывается большей для больших ионов, таких, как иодид, перхлорат и тетраэтиламмоний, чем для таких, как хлорид, фторид и натрий. Небольшие катионы, такие, как ионы лития и натрия, окружены гидратной оболочкой из довольно плотно связанных молекул воды, поэтому, применяя электростатическую теорию к этим ионам, обычно исходят из соответствующих радиусов гидратированных ионов, а не из их кристаллографических радиусов. Ионы мень-

ших размеров обладают более высокой плотностью заряда и будут иметь большие гидратные оболочки, и, таким образом, гидратация будет приводить к уменьшению различий в энергиях электростатических взаимодействий. Несомненно, существование слоя прочно связанных молекул воды играет большую роль, однако теоретическое вычисление энергий электростатических взаимодействий, основанное на «радиусах гидратированных ионов», сталкивается с той трудностью, что разные эксперименты приводят к сильно различающимся значениям числа связанных молекул воды для данного иона, хотя, как правило, согласуются в определении *порядка* возрастания степени гидратации для различных ионов [27—29]. Это не удивительно, так как гидратация не относится к явлениям, происходящим по принципу «все или ничего»; природа «гидратации» непрерывно изменяется между экстремальными случаями и может включать ряд совершенно различных процессов. С одной стороны, ион Sr^{3+} связывает воду настолько прочно, что скорость ее обмена с окружающей средой достаточно мала, чтобы ее можно было легко измерить. С другой стороны, иодид, безусловно, стабилизируется водой, что проявляется в большой энергии гидратации этого иона при переносе его из газовой фазы в воду, однако, согласно большинству экспериментальных данных, он не связывает воду достаточно сильно, чтобы образовывать гидратную оболочку. Совершенно иной тип «гидратации» обнаружен у очень больших ионов, таких, как наиболее крупные ионы тетралкиламмония, в которых заряд экранирован от растворителя; эти ионы ведут себя так, как будто вода вокруг них более структурирована, чем в остальном объеме. В различных экспериментальных методах проявляются различные свойства «гидратной оболочки», и поэтому они приводят к разным результатам. Особенно трудно интерпретировать при помощи понятия «гидратной оболочки» поведение ионов галогенов, так как их анионы больше по размерам, чем катионы сравнимого атомного номера, и, согласно большинству экспериментальных данных, галогениды (больших размеров, чем фторид) не окружены связанной гидратной оболочкой.

Несмотря на трудности количественного описания, электростатические взаимодействия демонстрируют особенно четко, что поведение молекул в водном растворе главным образом определяется свойствами самого растворителя. Рассмотрим образование ионных пар в воде. В качестве исходного состояния при вычислении энергии электростатического взаимодействия обычно берут ион в газовой фазе (рис. 5). Точные величины энергий сольватации или гидратации отдельных ионов являются в настоящее время предметом дискуссий, однако несомненно, что они находятся в пределах от -50 до -200 ккал/моль (от -240 до $-838 \cdot 10^3$ Дж/моль). Эти величины можно противопоставить свободной энергии образования ионных пар из одновалентных ионов в воде, не превышающей 1 ккал/моль ($4,2 \cdot 10^3$ Дж/моль). Энергия переноса иона из кристаллической фазы в водную также на несколько порядков меньше, чем теплота гидратации. Таким образом, энергия ионного взаимодействия в воде представляет собой небольшую разность между энергией стабилизации иона (за счет взаимодействия с диполями воды), переносимого из газовой фазы, и энергией взаимодействия с противоположно заряженным ионом в воде, который может сохранить все окружающие его молекулы воды или потерять часть из них при образовании ионной пары. Эти соотношения для некоторого гипотетического иона иллюстрируются рис. 5, где различия между энергиями иона в кристалле, растворе и ионной паре сильно преувеличены. Если бы зависимости этих энергий от радиусов катионов и анионов были точно известны, можно было бы предсказать энергии взаимодействий ионов в воде. Теория ионных взаимодействий в воде еще недостаточно разработана, чтобы произвести вычисление этих небольших *разностей* энергий исходя только из основных законов электростатики. Применение обычных уравнений электростатики для вычислений взаимо-

действий между атомами и молекулами на коротких расстояниях осложнено различными влияниями неэлектростатического характера и специфическими геометрическими факторами, присущими взаимодействиям типа ион-вода, ион-ион и ион-диполь. Помочь читателю ориентироваться в основных аспектах этой проблемы может следующий полуэмпирический и полуквантитативный подход.

В качестве иллюстрации рассмотрим проблему растворимости солей, которая более четко определяется и проще рассматривается, чем образование ионных пар. Растворимость соли зависит от разницы энергий ионов



Р и с. 5. Схема, представляющая связь энергии образования ионных пар и теплоты растворения иона с небольшими разностями между энергиями гидратации и кристаллической решетки. Различия в энергии иона в кристалле, растворе и ионной паре преувеличены.

в кристаллической решетке и в воде, т. е. от разности между свободной энергией кристаллической решетки и свободной энергией гидратации ионов. Энергия кристаллической решетки одно-одновалентной соли зависит от суммы радиусов r_1 и r_2 составляющих ее ионов и выражается эмпирическим уравнением [30]

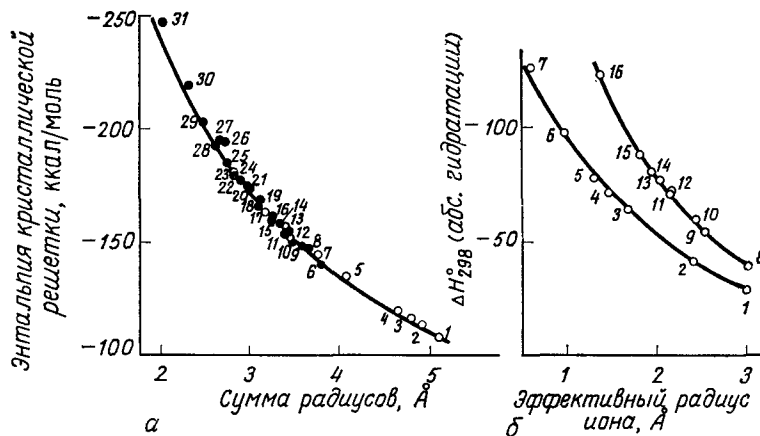
$$\Delta H_{298}^0 (\text{решетка}) = \frac{600}{r_1 + r_2} \left(1 - \frac{0,4}{r_1 + r_2} \right). \quad (4)$$

Для точной зависимости электростатической свободной энергии гидратации от радиуса иона нет общепринятого выражения [31], однако в любом своем варианте оно обязательно должно включать радиус данного иона плюс константу [уравнение (5)]

$$\Delta F_{el} = - \frac{C}{r + a}. \quad (5)$$

В действительности энергия взаимодействия иона с водой определяется рядом различных сил, включая силы Ван-дер-Ваальса, ион-дипольного и квадратного взаимодействия, которые по-разному зависят от ионных радиусов. При усреднении этих зависимостей получают, что различия в энергиях гидратации изменяются приблизительно как $(r + \alpha)^{-3}$, где α — эффективный радиус молекулы воды, равный 1,38 Å [32]. Энергии кристаллических решеток для ряда солей и энергии гидратации отдельных ионов, при вычислении которых использовали величину -261 ккал/моль ($-1090 \cdot 10^3$ Дж/моль) для протона, представлены на рис. 6. Сплошная линия для энергии кристаллической решетки вычислена по уравнению (4).

Теплота растворения данной соли определяется *разностью* между соответствующими точками на этих кривых, причем изменение теплоты растворения в некоторой последовательности солей (например, в ряду галогенидов) зависит от небольших различий в форме отдельных кривых. Так, если взять умеренно большой катион, такой, как ион цезия или тетраметиламмония, и варьировать природу аниона I^- , Br^- , Cl^- , F^- , то в этом ряду энергия гидратации возрастает быстрее, чем энергия кристаллической решетки,



Р и с. 6. а — Зависимость энтальпии кристаллической решетки от суммы эффективных ионных радиусов одно-одновалентных солей при 25 °С.

1 — NMe_4I ; 2 — NMe_4Br ; 3 — NMe_4Cl ; 4 — CsI_3 ; 5 — $CsClO_4$; 6 — CsI ; 7 — CsN_3 ; 8 — $CsBr$; 9 — $KClO_4$; 10 — KI ; 11 — KBF_4 ; 12 — $CsCl$; 13 — KN_3 ; 14 — $NaClO_4$; 15 — KCN ; 16 — KBr ; 17 — $NaBF_4$; 18 — NaI ; 19 — KCl ; 20 — CsF ; 21 — NaN_3 ; 22 — $NaBr$; 23 — LiI ; 24 — $LiBF_4$; 25 — $NaCl$; 26 — LiN_3 ; 27 — KF ; 28 — $LiBr$; 29 — $LiCl$; 30 — NaF ; 31 — LiF .

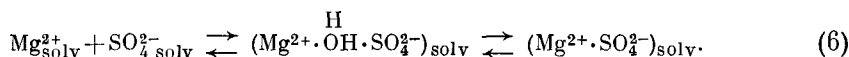
б — Абсолютные энтальпии гидратации одновалентных ионов при 25 °С.

1 — NMe_4^+ ; 2 — PhN_3^+ ; 3 — Cs^+ ; 4 — Rb^+ ; 5 — K^+ ; 6 — Na^+ ; 7 — Li^+ ; 8 — I_3^- ; 9 — $PhSO_3^-$; 10 — ClO_4^- ; 11 — I^- ; 12 — BF_4^- ; 13 — N_3^- ; 14 — Br^- , CN^- ; 15 — Cl^- ; 16 — F^- [30].

так как при данном изменении r_2 относительное изменение суммы $r_1 + r_2$ меньше, чем самого r_2 или $r_2 + \alpha$. Таким образом, нерастворимость солей, образованных большими катионами и анионами, такими, как перхлорат калия или фосфат циклогексиламмония, более правильно рассматривать как результат относительно малой энергии гидратации этих ионов, чем как проявление особой устойчивости кристаллического состояния. Энергии гидратации ионов таких солей просто не хватает для того, чтобы вытянуть их из кристаллической решетки в раствор.

К иному результату приводит рассмотрение солей, образованных небольшим катионом, таким, как ион лития, с теми же анионами галогенов. При *небольшой* величине r_1 в ряду I^- , Br^- , Cl^- , F^- изменение r_2 приводит к большому изменению энергии кристаллической решетки, чем энергии гидратации. Так, фторид лития имеет более прочную кристаллическую решетку и меньшую растворимость, чем хлорид лития. Рассмотренные закономерности иллюстрируются рис. 7. С использованием поправок на различия в энтропии этот подход успешно описывает растворимость солей, образованных ионами различных радиусов [30]. Альтернативный подход заключается в рассмотрении растворимости солей как функции *суммы и отношения* радиусов обоих ионов. Зависимости энергии кристаллической решетки и энергии гидратации от этих параметров таковы, что разность между этими энергиями гораздо более чувствительна к отношению, чем к сумме радиусов, и соли, ионы которых сильно отличаются по радиусам, растворимы лучше, чем соли, образованные близкими по размерам ионами [33].

Образование ионных пар в воде качественно можно рассмотреть таким же образом, однако сделать это количественно существенно труднее. Одна из принципиальных трудностей состоит в том, что ионные пары существуют в виде ряда структур, в которых ионы могут быть либо разделены молекулами растворителя, либо находиться в непосредственном контакте [схема (6)]



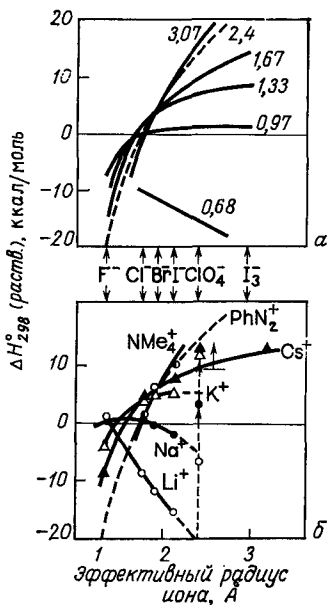
Эти формы трудно различать как при экспериментальном, так и теоретическом рассмотрении проблемы. Исследования релаксационных эффектов при поглощении звука в подобных системах вполне однозначно указывают на существование, по крайней мере двух различных частиц среди ионных пар, образованных 2 : 2-электролитом, и служат методом количественного измерения скоростей взаимопревращений этих частиц [34].

Согласно Бьерруму, классическое рассмотрение взаимодействия ионов в ионных парах базируется на основных законах электростатики и энергия взаимодействия вычисляется на основании значений диэлектрической проницаемости и обратных величин радиусов ионов. Так как энергия образования ионных пар в воде представляет собой небольшую разность больших чисел, неудивительно, что возникают большие трудности при таком рассмотрении ионных взаимодействий в воде. Действительно, тенденция к образованию ионных пар в водном растворе у больших ионов часто бывает эквивалентна или даже больше, чем у ионов меньших размеров [35], и соотношения Бьеррума чаще бы нарушались, чем выполнялись, если бы не использование переменных параметров, таких, как эффективные ионные радиусы или области диэлектрического насыщения, которые вводят для улучшения получаемых результатов. Так, измерения электропроводности и коэффициентов активности указывают на довольно интенсивное образование ионных пар в водном растворе иодида тетрабутиламмония, но образование ионных пар в растворах иодида тетраметиламмония и хлорида тетрабутиламмония происходит лишь в незначительной степени [36]. Энергия

взаимодействия двух ионов обратно пропорциональна сумме эффективных радиусов r_1 и r_2 , так что, как и в случае энергии кристаллической решетки, изменение r_2 в ряду анионов с постоянным катионом в зависимости от радиуса катиона r_1 может более сильно или более слабо влиять на энергию образования ионных пар, чем на энергию гидратации. Для *больших* катионов, таких, как алкиламмониевые группы ионообменных смол, возрастание энергии взаимодействия катиона с анионом при уменьшении размеров анионов в ряду I^- , Br^- , Cl^- , F^- происходит медленнее, чем возрастание энергии взаимодействия этих анионов с водой. Следовательно, более сильное связывание анионов больших размеров с ионообменными смолами может быть отнесено главным образом за счет того, что большие ионы, такие, как иодид, слабо взаимодействуют с водой и могут легко терять часть сольватной обо-

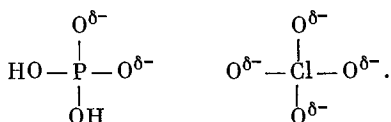
Р и с. 7. Теплоты растворения солей ряда катионов с анионами возрастающего радиуса.

а — вычисленные по разности между энергиями гидратации и кристаллической решетки; б — экспериментальные значения при 25°C. Прерывистая линия соответствует величинам, оцененным для бенздиазониевых солей. Числа при кривых (а) соответствуют радиусам катионов. Восходящая линия соответствует аномальным энthalпиям растворения перхлоратов [30].



лочки, чтобы взаимодействовать с ионообменником, в то время как небольшие ионы, такие, как фторид, настолько сильно сольватированы в воде, что могут лишь слабо взаимодействовать со смолой.

В случае многоатомных ионов, таких, как фосфат, перхлорат или ацетат, силы взаимодействия с водой будут определяться главным образом плотностью заряда на атомах кислорода

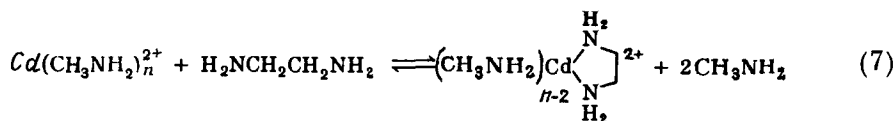


Так, отрицательный заряд в моноанионах ацетата и фосфата распределен между двумя атомами кислорода, в то время как в перхлорате он распределен между четырьмя атомами. Поэтому перхлорат слабее взаимодействует с водой, и это позволяет ему более сильно связываться с ионообменной смолой [37]. Высокая плотность заряда характерна для анионов высокой основности, поэтому высокоосновные анионы особенно прочно удерживают окружающие их молекулы воды и слабо взаимодействуют с ионообменной смолой. Те же принципы применимы к образованию ионных пар [38]. Для *небольших* ионов, обладающих высокой плотностью заряда, энергия ион-ионного взаимодействия будет изменяться быстрее с изменением ионных радиусов, чем энергия гидратации, поэтому тенденция к образованию ионных пар будет возрастать с уменьшением ионных радиусов. Так, устойчивость комплексов с ионом OH^- возрастает в ряду $\text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Ba}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{La}^{3+}$. В этом, а также еще в нескольких случаях удается найти простое количественное соотношение между ионным радиусом, плотностью заряда и устойчивостью ионных пар в воде [35]. Сильноосновные кислородсодержащие анионы, включая гидроксил и карбоксилаты, образуют комплексы, устойчивость которых соответствует приведенному выше ряду, и вполне вероятно, что здесь образуются ионные пары без включения молекул воды.

Тот же общий подход, основанный на концепции *силы анионного поля*, был использован Эйзенманом для объяснения сродства различных стеклянных электродов к катионам и распространен затем на ряд химических и биологических систем, включая ионообменные смолы, образование ионных пар и взаимодействие с мембранами [39]. Относительную шкалу энергий взаимодействия различных катионов с анионами переменной силы поля можно построить для галогенных солей эмпирически, сравнивая свободные энергии гидратации со свободными энергиями образования кристаллических галогенидов щелочных металлов. Получающиеся при этом результаты совпадают с зависимостями, представленными на рис. 7, и показывают, что для больших анионов, таких, как иодид, сила взаимодействия уменьшается в ряду $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$, в то время как для анионов небольшого размера, таких, как фторид, соответствующий ряд имеет вид $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$. При промежуточных значениях силы поля получают промежуточные ряды, которые согласуются с наблюдаемыми последовательностями специфичности стеклянных электродов. Аналогичные сопоставления, основанные на энергиях галогенидов щелочных металлов в виде двухатомного газа, их коэффициентах активности в концентрированном водном растворе и на вычисленных энергиях электростатического взаимодействия как функции ионных радиусов, приводят по существу к тем же результатам. Основность, т. е. энергия взаимодействия с протоном, может рассматриваться как особый случай ионного взаимодействия и лиганды, обладающие высокой основностью, такие, как OH^- , также имеют большую силу анионного поля и предпочтительно взаимодействуют с другими небольшими катионами, такими, как Li^+ и Na^+ .

Важность учета энергии гидратации ионов, в самом широком смысле этого слова, и ее зависимости от плотности заряда в течение многих лет подчеркивалась лишь при помощи ссылок на лиотропный ряд ионов Гофмейстера. Эта закономерность выполняется для большого числа физических, химических и биологических процессов с участием ионов в водном растворе и сама коррелирует с энергиями гидратации [17, 18]. В настоящее время существует проблема более количественного выражения этих взаимоотношений и получения более четких сведений о деталях строения и электростатической энергии взаимодействия молекул воды вблизи ионов различного размера и структуры.

Способность взаимодействующих групп связываться с данным ионом в разбавленном растворе будет сильно возрастать, если две или большее число таких групп входят в состав структуры макромолекулы или хелатного агента. Соединение иона с одним или несколькими лигандами связано с ограничением подвижности взаимодействующих молекул, что проявляется в отрицательной энтропии ассоциации. Если эти изменения подвижности уменьшить, объединив группы в одну молекулу в исходном состоянии, то потери энтропии при соединении с ионом будут уменьшены и образование комплекса облегчено. Это есть сущность процесса хелатообразования. В качестве иллюстрации рассмотрим обмен молекул этилендиамина и метиламина в координационной сфере иона кадмия [схема (7)].



Этот процесс происходит самопроизвольно и характеризуется величинами $\Delta F = -1,3$ ккал/моль ($-5,45 \cdot 10^3$ Дж/моль) и $\Delta S = 4,4$ энтр. ед. ($17,6$ Дж/моль $\cdot$ К), если выражать константу равновесия в обычных единицах молярности. Понижение энтропии, необходимое для фиксации одной молекулы этилендиамина, меньше, чем требуется для фиксации двух молекул метиламина в координационной сфере иона, если все реагенты и продукты находятся в стандартном состоянии, т. е. в концентрации 1 моль/л.

В большинстве случаев при вычислении «движущей силы» хелатообразования совершенно произвольно используют в качестве стандартного состояния реагентов для выражения констант равновесия концентрации 1 моль/л. Можно избежать возникновения произвольного концентрационного-энтропийного вклада в комплексообразование, если использовать в качестве стандартного состояния мольную долю, равную 1,0, вместо концентрации 1 моль/л. Если выразить константу равновесия реакции (7) в мольных долях, свободная энергия процесса изменится до *положительной* величины 1,0 ккал/моль ($4,19 \cdot 10^3$ Дж/моль), а ΔS — до $-3,5$ энтр. ед. ($-14,8$ Дж/мол $\cdot$ К). Можно сказать, что ион кадмия, полностью окруженный молекулами метиламина или этилендиамина, при мольной доле 1,0 не будет обладать энтропийными преимуществами в комплексе с последними, которые обеспечивали движущую силу хелатообразования в разбавленном растворе [40]. Аналогичным образом связывание иона магния с отдельными ацетатными ионами едва поддается измерению, в то время как тот же ион прочно связывается с четырьмя объединенными карбоксильными группами этилендиаминтетраацетата в разбавленном растворе. В хелатных агентах создается высокая локальная концентрация связывающихся групп, благодаря чему преодолеваются низкое сродство иона к отдельным группам и неблагоприятное уменьшение энтропии при концентрировании (сближении) групп, которое необходимо для перенесения четырех ацетатных ионов из разбавленного раствора в координационную сферу иона магния. С другой стороны, эту же проблему

можно рассмотреть исходя из оценки потерь трансляционной энтропии при комплексообразовании, которые больше для монофункциональных лигандов, чем для хелатных агентов, а также учесть поправки на потери ротационной энтропии, если связывающаяся молекула хелатного агента обладает определенной гибкостью [41]. Выводы, полученные при таком подходе, совпадают с описанными выше; хелатный эффект пятичленного кольца примерно при комнатной температуре близок к $-RT \ln 55,5$, что эквивалентно $\sim 2...3$ ккал/моль ($8,2...12,6 \cdot 10^3$ Дж/моль) или $8...11$ энтр. ед ($33,5 - 46$ Дж/моль·К).

Так как свободные энергии взаимодействия одновалентных ионов в водном растворе, как правило, малы, вполне вероятно, что сильные взаимодействия, обнаруживаемые в некоторых случаях между белками и ионами, становятся возможными благодаря, во-первых, хелатному эффекту описанного типа, во-вторых, неэлектростатическому связыванию незаряженных групп, присоединенных к иону, в-третьих, тому, что заряженный центр на белке может находиться в слабо сольватирующем ионы микроокружении, так что его нейтрализация при связывании с противоположно заряженным ионом сопровождается большим выигрышем свободной энергии.

Часто допускают, что движущей силой связывания больших ионов с полимерами является неэлектростатическое притяжение, обусловленное гидрофобными или дисперсионными силами Ван-дер-Ваальса — Лондона. Эти силы действительно имеют большое значение, если в молекуле большая гидрофобная группа асимметрично присоединена к заряженной группе, как в детергенте. Однако в случае симметричных ионов обычно трудно или даже невозможно найти экспериментальную основу для оценки вклада взаимодействий этого типа или отделить их влияние от электростатического и сольватационного эффектов, рассмотренных выше, которые несомненно в значительной степени определяют силу взаимодействия. Несмотря на то что некоторые сильно взаимодействующие ионы имеют большие размеры и высокую поляризуемость (например, иодид и перхлорат), другие ионы, обладающие такими же размерами и поляризуемостью (например, фосфат и ацетат), взаимодействуют слабо, так что, по-видимому, должны иметь место специфические эффекты, такие, как стерическое соответствие и ориентация поляризуемости, если взаимодействия могут вносить существенный вклад в энергию связывания.

Закономерности, похожие на те, которые проявляются при связывании ионов с макромолекулами и ионообменными смолами, обнаруживаются при рассмотрении десорбции ионов с поверхности воды — явление, которое не может быть связано с гидрофобными или вандерваальсовыми взаимодействиями. Поверхностное натяжение является мерой когезионной энергии раствора, поэтому вещества, которые увеличивают когезионную энергию (сюда относится большинство солей), увеличивают поверхностное натяжение и десорбируются из поверхностного слоя, в то время как вещества, понижающие среднюю когезионную энергию, такие, как спирты, уменьшают поверхностное натяжение и концентрируются в поверхностном слое. Причина десорбции гидратированных солей ясна: ион не может быть полностью гидратирован, если он находится в поверхностном слое. Влияние на поверхностное натяжение практически одинаково для всех солей, образованных сильно гидратированными ионами, которые почти полностью десорбируются с поверхности. К ним относятся все простые катионы щелочных металлов Na^+ , K^+ , Rb^+ и Cs^+ , а также ион NH_4^+ и сильно гидратированные анионы, такие, как F^- и OH^- . Однако анионы больших размеров гидратированы намного слабее и могут находиться в поверхностном слое, не теряя при этом существенно энергию гидратации. Следовательно, существуют большие различия во влиянии солей этих ионов на поверхностное натяжение, причем степень десорбции с поверхности уменьшается в ряду

$F^- > OH^- > Cl^- > BrO_3^- > Br^- > NO_3^- > I^- > ClO_4^- > SCN^-$. Этот ряд очень близок к рядам, предложенным для других явлений, описанным выше [42]. Если ион достаточно велик и слабо сольватирован, он должен концентрироваться в поверхностном слое и вызывать *понижение* поверхностного натяжения. Это действительно справедливо для солей иона PF_6^- . Можно ожидать, что очень близкие по свойствам ряды должны наблюдаться для других процессов, которые включают перенос ионов из объема водного раствора на поверхность, где эти ионы взаимодействуют с каким-либо инертным по отношению к воде веществом. К ним относятся адсорбция ионов на поверхностях ртутного и других электродов, создающих электрический потенциал [43], адсорбция на поверхностях раздела между водой и неполярными органическими жидкостями [44] и высаливание неполярных растворенных веществ.

2. КОНЦЕНТРИРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ СОЛЕЙ

а) *Высаливание*

В соответствии с классической электростатической теорией высаливание неполярных органических молекул является следствием повышения энергии растворенных ионов в результате понижения диэлектрической проницаемости. Связь между повышением энергии и составом раствора отражена количественно уравнением

$$\frac{\delta \ln f_2}{\delta n_1} = -\frac{\delta \ln f_1}{\delta n_2}, \quad (8)$$

где f_1 и f_2 — коэффициенты активности, n_1 и n_2 — количества добавляемых к воде веществ. Из этой обратной зависимости следует, что дестабилизация соли в водном растворе при добавлении органического вещества должна сопровождаться соответствующей дестабилизацией органического вещества при добавлении соли, т. е. возрастанием его коэффициента активности и понижением растворимости. Это уравнение выполняется независимо от конкретного механизма стабилизации или дестабилизации.

Электростатическая теория высаливания, основанная на рассмотрении диэлектрической проницаемости раствора, была развита Дебаем, Кирквудом и другими. Диэлектрическая проницаемость, безусловно, должна влиять на растворимость, однако макроскопическая диэлектрическая проницаемость слишком приближенно характеризует сольватационную способность растворителя при изменении ее в более или менее широких пределах. Теории этого типа обладают двумя серьезными недостатками: во-первых, они не объясняют больших различий в высаливающей способности различных солей; во-вторых, они не объясняют всаливания неполярных соединений под действием некоторых солей (рис. 4). В табл. 3 сопоставлены экспериментально найденные константы высаливания для бензола с данными, вычисленными по теории Дебая и по модифицированному Кирквудом варианту этой теории. Очевидно, эти теории предсказывают слабые различия между разными солями, и, что особенно характерно, из них следует, что бромид тетраметиламмония должен вести себя как обычная соль, хотя в действительности он всаливает бензол [25, 45]. Электростатические теории могут быть улучшены путем учета дополнительных факторов. Допускают существование оболочки жесткоориентированных молекул гидратной воды вокруг небольших с высокой плотностью заряда ионов, из которой полностью исключены молекулы органических веществ [46]. Производится также оценка сил взаимодействия Ван-дер-Ваальса — Лондона между солью и растворенным органическим веществом. К сожалению, эти модификации теории не устраняют всех трудностей, если рассматривать достаточно широкий ряд солей.

Таблица 3

Высаливание бензола [25, 45]

Соль	h_s				$V_s - \bar{V}_s^*$
	эксперимен- тально наблюдаемые	вычисленные по теории Дебая	вычисленные по варианту Кирквуда	вычисленные по уравнению (9) $\times 0,3$	
Na ₂ SO ₄	0,55			0,58	53
NaOH	0,26			0,26	22,3
NaF	0,25	0,13	0,13	0,21	18,6
NaCl	0,20	0,13	0,13	0,16	12,8
KCl	0,17			0,12	10,3
CsCl	0,09	0,12	0,11	0,10	8,7
LiCl	0,14	0,13	0,14	0,12	10,4
NaClO ₄	0,11			0,08	
NaBr	0,16			0,14	13,6
NaI	0,10	0,12	0,12	0,08	
NH ₄ Cl	0,10	0,12	0,11	0,10	9,0
(CH ₃) ₄ NBr	-0,10	0,11	0,09	-0,11	-10
(C ₂ H ₅) ₄ NBr	-0,25			-0,26	-23
(C ₃ H ₇) ₄ NBr	-0,41			-0,37	-32

Более успешно используются приближения, основанные на экспериментально наблюдаемых устойчивостях ионов в различных растворителях и водно-органических смесях, мерой которых служит функция Y Грюнвальда и Винштейна [47] или функция Z Косовера [48]. Однако при таком подходе по существу используют лишь иные выражения соотношения (8), но это не способствует более глубокому проникновению в механизм взаимодействий между ионом, растворителем и растворенным органическим веществом.

Гораздо удачнее оказывается полумпирическое рассмотрение проблемы высаливания, основанное на учете влияния солей на плотность когезионной энергии или внутреннее давление воды [25, 45, 49]. Внесение неполярной молекулы в воду можно разделить на две стадии: разъединение молекул воды с образованием полости, в которой может поместиться вносимая молекула, и внесение молекулы в эту полость. При растворении неполярных молекул, которые не могут сильно взаимодействовать с водой, основная часть свободной энергии, требуемой для осуществления процесса, должна затрачиваться на уменьшение взаимного сцепления молекул воды на первой стадии. Это основная причина низкой растворимости органических веществ в воде, если их молекулы недостаточно полярны, чтобы, взаимодействуя с водой на второй стадии, компенсировать эти затраты свободной энергии (гл. 8). Таким образом, добавление какого-либо вещества, способного увеличивать среднюю когезионную энергию, т. е. энергию сцепления молекул воды между собой, будет затруднять их разъединение на первой стадии процесса растворения. Напротив, добавление таких веществ, как спирты, которые способны уменьшать среднее взаимное сцепление молекул воды, будет облегчать этот процесс. Большинство солей увеличивает среднюю силу взаимного сцепления молекул воды и плотность когезионной энергии водного раствора. Это проявляется экспериментально в электрострикции и возрастании поверхностного натяжения. Таким образом, в соответствии с рассмотренной моделью в большинстве случаев должно наблюдаться высаливание неполярных веществ, неспособных сильно взаимодействовать с водой. Высаливание можно рассматривать просто как выталкивание неполярных молекул, вызываемое электрострикцией и увеличением средней силы взаимного сцепления молекул растворителя в присутствии соли.

Когезионную энергию раствора можно выразить через его внутреннее давление. Вклад этого эффекта в высаливание можно оценить, используя связь между изменением внутреннего давления, вызываемого электрострикцией и константой высаливания в соответствии с уравнением

$$k_s = \frac{\bar{V}_i^\circ (V_s - \bar{V}_s^\circ)}{2,3\beta_0 RT}, \quad (9)$$

где $\bar{V}_i^\circ$ и $\bar{V}_s^\circ$ — парциальные молярные объемы растворяемого неполярного вещества и соли соответственно, V_s — молярный объем растворенной соли, β_0 — сжимаемость воды. Все эти параметры легко доступны измерению, за исключением V_s . Эту величину можно оценить с удовлетворительной точностью из данных по сжимаемости и из других данных.

Подобное соотношение успешно объясняет последовательность изменения эффективности различных солей в высаливании бензола и после поправки на фактор примерно 3, который имеет свое обоснование [49], приводит к теоретически рассчитанным величинам k_s , прекрасно согласующимся с найденными экспериментально для ряда солей при высаливании бензола (табл. 3). Плотность заряда на поверхности достаточно большого иона меньше, чем на концах диполя воды, поэтому такие ионы будут взаимодействовать с молекулами воды слабее, чем молекулы воды между собой, и будут приводить к *уменьшению* плотности когезионной энергии и внутреннего давления раствора. Добавление солей таких ионов должно, следовательно, облегчать растворение неполярных веществ в воде. Наиболее важное достижение теории, основанной на использовании внутреннего давления, заключается в предсказании всаливания бензола бромидом тетраметиламмония, который имеет *положительный* объем растворения (т. е. разность $V_s - \bar{V}_s^\circ$ отрицательна, табл. 3). Кроме того, эта теория позволяет удовлетворительно объяснить увеличение констант высаливания с ростом объема растворенного вещества, а также тот факт, что большие ионы тетраэтиламмония, вплоть до тетрапропиламмония, обладают сильно выраженным всаливающим действием по отношению к бензолу [45].

б) Макромолекулы

Изменения физического состояния макромолекул, происходящие в концентрированных растворах солей, определяются главным образом изменением коэффициентов активности тех участков макромолекулы, у которых изменяется степень контакта с растворителем при изменении ее состояния, так что объяснение влияния концентрированных растворов солей на физическое состояние макромолекул упирается в проблему установления природы изменений коэффициентов активности [уравнение (1)]. В случае белков и нуклеиновых кислот важнейшими структурными элементами, изменяющимися, по всей вероятности, свои коэффициенты активности в присутствии солей, являются заряженные, гидрофобные или неполярные группы, такие, как алифатические и ароматические боковые цепи аминокислот и основания нуклеиновых кислот, а также полипептидная цепь белков и дизфирная фосфатная цепь полинуклеотидов.

Непосредственные электростатические взаимодействия между *заряженными группами* существуют при низких концентрациях солей, но обычно имеют меньшее значение при их высоких концентрациях, когда простую теорию Дебая — Хюккеля уже нельзя применять для расчета с солями. Денатурация белков при высоких и низких значениях pH вызывается главным образом взаимным отталкиванием одноименно заряженных групп, которое уменьшается в разбавленных растворах солей, экранирующих заряженные группы. Аналогично высокая плотность заряда двойной спирали ДНК

приводит к плавлению спирали и денатурации вследствие электростатического отталкивания при низкой концентрации соли. Диссоциация полимеров на субъединицы в присутствии солей может вызываться электростатическим взаимодействием соли с заряженными группами, поддерживающими надмолекулярную структуру полимера; возможно, примером этого является диссоциация гемоглобина на субъединицы в присутствии хлорида кальция [50].

Из имеющихся в настоящее время данных, однако, можно заключить, что воздействие на заряженные группы в общем мало существенно при рассмотрении влияния концентрированных солей на денатурацию и осаждение белков в нейтральной области рН. Абсолютная растворимость белка, такого, как карбоксигемоглобин, зависит от рН, поскольку белок имеет минимальную растворимость, когда его общий заряд близок к нулю. Однако влияние концентрированных растворов солей на его растворимость, мерой которой является величина k_s , характеризующая высаливание, по-видимому, не зависит от рН и заряда белка [26]. Это показано на рис. 8, где приведены данные по влиянию фосфата на растворимость карбоксигемоглобина. Величины k_s , найденные из наклонов прямых на рис. 8, не меняются в интервале значений рН 6,05...7,43. Абсолютная растворимость изменяется в этом же интервале на порядок, причем проходит через минимальное значение. (К сожалению, в этом эксперименте был использован фосфат, который претерпевает ионизацию в исследуемом интервале значений рН; поэтому высаливание рассматривается в зависимости от общей ионной силы, а не от концентрации соли.)

Тот факт, что нет необходимости учитывать взаимодействия с заряженными группами для объяснения влияния концентрированных растворов солей на денатурацию белков, становится наиболее очевидным при рассмотрении плавления желатинового геля, которое представляет собой одну из форм денатурации. Влияние концентрированных растворов солей на температуру плавления желатины остается постоянным при изменении рН в пределах 2...11,7, хотя при предельных значениях рН все карбоксильные и амино-группы соответственно переходят в незаряженную форму. Более того, устранение заряженных групп путем ацетилирования амино-групп, этерификации карбоксильных групп и нитрования большинства гуанидиновых групп не оказывает существенного влияния на вызываемое солью изменение температуры плавления [7]. Даже в случае спирали ДНК, обладающей высокой плотностью отрицательного заряда, денатурация, вызываемая концентрированными растворами солей, зависит от природы аниона больше, чем от природы катиона, и лучше может быть объяснена влиянием солей на незаряженные основания, чем на заряженные группы полимера [24, 51]. Очевидно, взаимодействие солей в концентрированном растворе с незаряженными участками полимеров способно вызывать изменения в его физическом состоянии. Неудивительно, что взаимодействия с заряженными группами играют незначительную роль в денатурации белков при нейтральных значениях рН, так как заряженные группы обычно находятся в контакте с растворителем на поверхности глобулы нативного белка, вследствие чего они могут взаимодействовать с солями одинаковым образом как в нативном, так и в денатурированном состояниях. Следовательно, равновесие

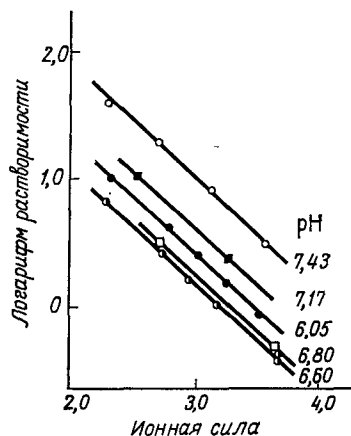
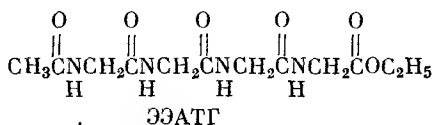


Рис. 8. Высаливание карбоксигемоглобина фосфатом в зависимости от ионной силы раствора при значениях рН выше и ниже минимальной растворимости карбоксигемоглобина [26].

между обеими формами белка не должно смещаться в результате более сильного взаимодействия одной из них с солью.

Так как *неполярные* группы полимеров в процессе изменения состояния макромолекулы выходят на поверхность и становятся доступными для растворителя, влияние солей на коэффициенты активности таких групп может изменить положение равновесия. На основании большого числа экспериментальных данных по влиянию солей на растворы простых органических модельных соединений, таких, как бензол (рис. 4), появляется возможность предсказывать относительную эффективность различных солей в тех случаях, когда определяющим является их влияние на неполярные группы: соли, которые эффективно высаливают неполярные соединения (например, сульфаты и фториды), должны препятствовать переходу макромолекулы в состояние, в котором неполярные группы становятся доступными для растворителя; соли, увеличивающие растворимость неполярных соединений (например, бромистый тетраметиламмоний), напротив, должны облегчать такой переход. Несмотря на то что эффекты такого типа могут существовать и вносить значительный вклад в денатурацию белков под действием концентрированных растворов солей, из имеющихся в настоящее время данных следует, что для большинства белков они не являются основными. Так, ион тетраметиламмония не оказывает, как правило, существенного влияния на белки, а натриевые и калиевые соли ионов Γ^- , NO_3^- , ClO_4^- и хлориды Ba^{2+} , Ca^{2+} и Mg^{2+} вызывают денатурацию и солюбилизацию многих белков, хотя обладают *высаливающим* действием на бензол и другие неполярные соединения. Более того, часто убеждаются в том, что влияние солей на белки нечувствительно к природе катиона в ряду Na^+ , K^+ , Cs^+ , Rb^+ , в то время как коэффициенты активности простых неполярных молекул сильно различаются для различных катионов этой группы.

Существует гораздо более точная корреляция между влиянием концентрированных растворов солей на белки и на их растворимость и коэффициентом активности этилового эфира ацетилтетраглицина (ЭАТГ) — модельного соединения, построенного главным образом из амидных групп (табл. 1 и 2) [8].



Это указывает на то, что воздействие концентрированных растворов солей на белки осуществляется в основном путем стабилизирующего или дестабилизирующего влияния на *амидные группы*, у которых изменяется степень доступности для растворителя при изменении физического состояния белка. Те соли, которые способствуют денатурации, растворению и диссоциации белков, а именно LiBr , NaI , NaSCN , CaCl_2 , гидроксид гуанидина и динодосалицилат лития, увеличивают растворимость упомянутого выше модельного полиамида и, следовательно, должны благоприятствовать таким изменениям в состоянии белка в растворе, при которых происходит увеличение степени контакта амидных групп с растворителем. Наоборот, соли, препятствующие денатурации и способствующие осаждению и агрегации белков, такие, как сульфаты, фосфаты, ацетаты, фториды и цитраты, понижают растворимость ЭАТГ, и в их присутствии уменьшается степень контакта амидных групп с растворителем. Выражаясь более формально, соли первой группы уменьшают коэффициент активности амидных групп, находящихся в контакте с растворителем, и, согласно уравнению (1), увеличивают концентрацию «развернутого» белка, в котором присутствует большое число таких групп; соли второй группы вызывают противоположный эффект. Хотя для солей, являющихся промежуточными между этими двумя группами, характер вызываемых ими эффектов зависит от природы белка (возможно, из-за раз-

личного вклада взаимодействий с гидрофобными и заряженными группами), крайние члены этих групп одинаково влияют на большое число различных белков. Более того, поведение модельного амида аналогично поведению белков в присутствии даже тех солей, которые противоположным образом влияют на амидную связь и на неполярные соединения. ЭЭАТГ и белки обладают относительно нечувствительностью к природе катиона в ряду Na^+ , K^+ , Cs^+ , $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$. Было бы преждевременным делать количественные сопоставления, однако интересно отметить, что константы высаливания k_s для ЭЭАТГ составляют одну пятую от соответствующих констант для гемоглобина. Таким образом, можно полагать, что высаливание гемоглобина объясняется удалением соли из непосредственного окружения участка молекулы гемоглобина, эквивалентного лишь пяти молекулам ЭЭАТГ при переходе белка из раствора в твердое состояние. Этот вывод представляется разумным, так как основная часть поверхности кристаллического белка остается окруженной молекулами растворителя и изменение коэффициента активности, приводящее к осаждению, должно затрагивать лишь те области поверхности, которые примыкают к другим молекулам и не имеют контакта с солью и растворителем в кристалле.

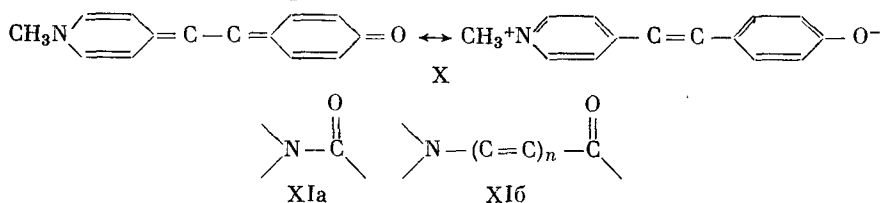
Денатурация ДНК под действием концентрированных растворов солей, которая обнаруживает тот же порядок чувствительности к природе соли, что и денатурация белков, может быть объяснена также влиянием солей на коэффициенты активности оснований нуклеиновых кислот, которые в денатурированной ДНК более доступны для растворителя, чем в нативной [51]. Такое поведение ДНК становится понятным, если учесть, что гетероциклические основания содержат большие диполи и построены в значительной степени из карбонильных групп, примыкающих к атомам азота; фактически они обладают свойствами циклических амидов.

Детали «микроскопического» механизма влияния концентрированных растворов солей на белки, пептиды, нуклеиновые кислоты и другие полярные растворенные вещества довольно неопределенны. Высаливание этих соединений и их составных частей, по-видимому, происходит по сложному механизму, являющемуся результатом наложения нескольких различных механизмов, как и в случае высаливания менее полярных соединений. Значения k_s для полярных растворенных веществ меньше, чем для неполярных того же объема, так как полярные молекулы сильнее взаимодействуют с растворителем; при достаточно высокой полярности наблюдается всаливание. Теория, основанная на рассмотрении внутреннего давления, по-видимому, дает в настоящее время наиболее удовлетворительное объяснение *высаливанию* как полярных, так и неполярных веществ.

Всаливание, наблюдаемое для модельных амидов, оснований нуклеиновых кислот и полимеров проще всего объясняется прямым взаимодействием между диполями этих соединений и ионами, находящимися в растворителе, однако природа этих взаимодействий не вполне определена и такое объяснение не строго обоснованно. Для слабых ион-дипольных взаимодействий этого типа трудно провести четкую границу между образованием стехиометрических ион-дипольных комплексов и неспецифическим взаимодействием ионов с диполем, которое следует из данных по влиянию на коэффициенты активности и соотношения (8). Подтверждением существования прямых ион-дипольных взаимодействий может служить хорошая корреляция, наблюдающаяся между влиянием анионов на ЭЭАТГ и их сродством к ионообменным смолам и связыванием с заряженными группами в разбавленном растворе (табл. 1). Во всех этих случаях, по-видимому, большие и слабо сольватированные ионы способны легко терять достаточное количество сольватной воды, чтобы эффективно взаимодействовать с зарядами или диполями с относительно слабым полем. Можно предположить, что молекула растворенного вещества находится в некоторой полости, образованной в растворителе. Тогда ионы,

способные находиться в поверхностном слое (как это следует из их влияния на поверхностное натяжение), будут концентрироваться на поверхности полости и взаимодействовать с диполем молекулы растворенного вещества, находящимся внутри нее.

Дальнейшим подтверждением наличия прямых взаимодействий с ионами служит влияние солей на мероцианиновый краситель X, который можно рассматривать как винилот (XI б) амида (XI а), где атом азота и карбонильная группа разделены системой двойных связей, через которую может происходить обычный для амидов резонанс.



Изменение спектра поглощения этого красителя в присутствии концентрированных растворов солей происходит с сохранением изоспестической точки, а не представляет собой непрерывный сдвиг максимума поглощения с ростом концентрации соли. Отсюда, а также из того факта, что для некоторых солей изменения в спектре имеют ту же зависимость от концентрации соли, как и в случае простой реакции ассоциации (с константой ассоциации порядка 1 л/моль), следует, что между красителем и одним из ионов соли образуется ион-дипольный комплекс. Это комплексообразование не объясняет полностью влияния солей на растворимость и коэффициент активности красителя, но, по-видимому, прямое взаимодействие вносит основной вклад в наблюдаемые солевые эффекты [52].

Исходя из того факта, что какой-либо ион или небольшая молекула вызывает изменение в состоянии макромолекулы при взаимодействии с некоторой группой, входящей в ее состав, часто считают, что взаимодействия такого же рода между группами на макромолекуле обеспечивают ее устойчивость в исходном состоянии. Этот вывод ошибочен. Ситуация может быть рассмотрена при помощи некоторой аналогии с «правилом рыболовного крючка»: из того, что молекулу белка можно растянуть, зацепив крючками за ее концы, не следует, что исходная структура белка поддерживается при помощи крючков.

Особенно заманчиво пренебречь этим правилом в случае ионных взаимодействий и, например, считать, что заряженные группы создают движущую силу ассоциации белка, если белок может диссоциировать при добавлении соли. Допустим, что заряженные группы на полимере примыкают к диполям

пептидных связей и что свободная энергия их переноса в воду равна нулю или даже отрицательна (рис. 9). Другая возможность состоит в образовании ионной пары в полимере, но это не будет сказываться на стабильности полимера, так как одно-одновалентная ионная пара, как известно, обладает малой устойчивостью в воде. В любом случае добавление соли, которая энергетически благоприятно взаимодействует с заряженными группами, будет способ-

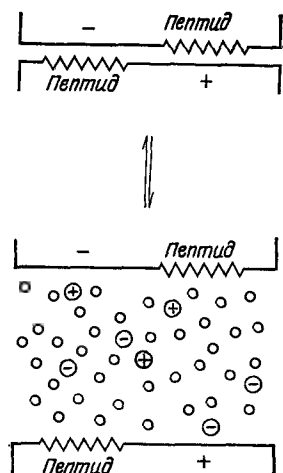


Рис. 9. Схематическое представление увеличения степени доступности заряженных групп для растворителя и денатурации белка в результате энергетически благоприятного взаимодействия этих групп с водным раствором соли в случае, когда заряженные группы сами по себе не обеспечивают хотя бы частично устойчивости нативного белка.

ствовать увеличению степени контакта этих групп с растворителем и диссоциации полимера, хотя заряженные группы не вносят никакого вклада в устойчивость полимера. Известно, что большие анионы прочно связываются с определенными белками, так что их диссоциация по такому механизму вполне возможна. Более того, соли могут оказывать воздействие на группы с нейтрализованными зарядами. Так, гемоглобин диссоциирует от тетрамера до димера в присутствии солей, и можно полагать, что устойчивость тетрамера обусловлена ионными взаимодействиями, которые исчезают при добавлении солей. Однако различные соли располагаются по эффективности воздействия в том же порядке, что и при взаимодействии с пептидом ЭАТГ, и диссоциация, следовательно, может происходить частично или полностью в результате взаимодействия солей с амидными группами по местам контакта субединиц без затрагивания заряженных групп [50, 53]. Таким же образом может быть объяснена деполимеризация F-актина [22].

Возникновение аналогичных ситуаций в случае других компонентов макромолекул, таких, как гидрофобные группы, также, если не более, вероятно. Вывод, который можно сделать из того, что данный тип взаимодействия вызывает изменения в физическом состоянии макромолекулы, заключается в том, что взаимодействующие группы макромолекулы изменяют свою степень контакта с растворителем при изменении физического состояния и что они *могут* поддерживать данную структуру макромолекулы, в которой они в меньшей степени доступны для растворителя.

в) «Структура» воды

Полная теория влияния солей на взаимодействие между водой и растворенными веществами должна связать с рассматриваемым явлением изменения энтальпии, энтропии, объема, диэлектрической проницаемости и «структуры» воды и должна дать более детальное описание структуры и свойств раствора, чем это удастся сделать при помощи полуэмпирических теорий, основанных на рассмотрении плотности когезионной энергии и внутреннего давления. Хотя некоторые шаги в этом направлении уже сделаны, автор не уверен в том, что детальное чисто теоретическое рассмотрение в состоянии дать адекватное описание свойств водных растворов в настоящее время; эти начинания, однако, могут служить прекрасным стимулом для обсуждения роли тех или иных факторов. Помимо электростатических эффектов, наиболее часто рассматриваемым аспектом взаимодействия солей с водой является влияние солей на «структуру» воды [54—57]. Похоже, что добавление любого вещества к воде сопровождается изменением одного или ряда параметров, которые используют в качестве меры упорядоченности структуры воды. Интересно рассмотреть связь этих изменений с другими проявлениями влияния солей на растворы. Эти структурные изменения будут несомненно включены, например, в законченную теорию высаливания, однако предположение о существовании причинно-следственной связи между структурными изменениями и высаливанием не вполне согласуется с детальным критическим рассмотрением связи между изменениями структуры и наблюдаемыми изменениями свободной энергии взаимодействия между растворителем и растворенным веществом. Интерпретация, основанная на рассмотрении структуры воды, не всегда даже оказывается внутренне согласованной в вопросе о направлении эффекта, приписываемого возрастанию или уменьшению структурированности воды.

Здесь уместно привести некоторые сведения относительно влияния солей на «структуру» воды. Вследствие сильного межмолекулярного взаимодействия молекулы воды взаимно расположены не хаотически, а образуют некоторые непродолжительно существующие структурированные области, так называемые «кластеры» [55, 57]. Эти участки связанных водородными связя-

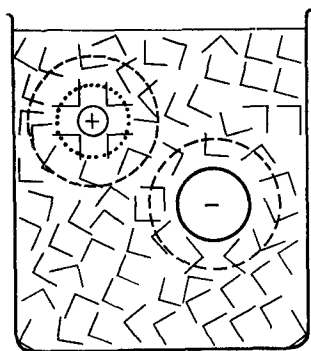
ми молекул воды обладают свойствами некоторых форм льда, и, по всей вероятности, их структура не совпадает со структурой обычного льда.

Появление иона с окружающим его электрическим полем изменяет ситуацию, причем довольно сложным образом. Уже отмечалось, что небольшие высокозарядные ионы ориентируют непосредственно окружающие их молекулы воды с образованием плотной гидратной оболочки, которая длительное время удерживается около иона и обладает свойствами, совершенно отличными от свойств обычной воды (рис. 10, область внутри точечной окружности). Эти молекулы воды определяют число гидратации и радиус гидратированного иона, хотя эти параметры меняются в широких пределах в зависимости от метода их определения [27—29]. Несомненно, что вода в гидратных оболочках более структурирована, чем в обычном состоянии. За пределами гидратной оболочки, а также в непосредственной близости к поверхности ионов больших

размеров электростатическое поле недостаточно сильно, чтобы связывать молекулы воды, но оно еще в состоянии эффективно конкурировать с диполь-дипольными взаимодействиями, обеспечивающими ориентацию и структурирование молекул в жидкой воде. Влияние этих сил можно сравнить с последствиями возможного появления «Битлзов» в Бостонском симфоническом оркестре: силы различных типов конкурируют между собой, что приводит к возрастанию разупорядоченности и энтропии системы (рис. 10, область внутри штриховой окружности). Ионы еще большего размера, у которых заряд экранирован от растворителя объемистыми углеводородными заместителями, обладают настолько низкой поверхностной плотностью заряда, что не оказывают значительного воздействия на растворитель, и такие ионы ведут себя так же, как соответствующие углеводороды, т. е. ограничивают движение и увеличивают упорядоченность окружающих молекул воды, как это описано в следующей главе.

Итак, существуют по крайней мере два типа «структурирующих» ионов: небольшие ионы с высокой плотностью заряда, ориентирующие окружающие молекулы воды при помощи сильного электростатического взаимодействия, и ионы очень большого размера, которые ориентируют окружающие молекулы воды потому, что их электростатическое поле слишком слабо, чтобы в заметной степени влиять на растворитель. Поэтому параметры, являющиеся мерой структурированности воды, оказываются максимальными для самых больших и для самых малых ионов и минимальными для «деструктурирующих» ионов средних размеров. В качестве примера можно привести влияние солей на вязкость воды (рис. 11) [58]. Так как эффекты структурирования под действием очень больших и очень малых ионов имеют различную природу, не удивительно, что влияние этих ионов на различные свойства водных растворов часто не удается объяснить исключительно с точки зрения их влияния на структуру воды.

Наиболее доступными параметрами, которые, по-видимому, могут служить мерой «структурированности» воды, являются вязкость, энтропия, скорость самодиффузии и период диэлектрической релаксации воды. Влияние ионов и неполярных веществ на диэлектрическую релаксацию воды рассмотрено в следующей главе. Влияние ионов на вязкость воды можно рассматривать в трех аспектах: влияние непосредственно на вязкость (или обратную

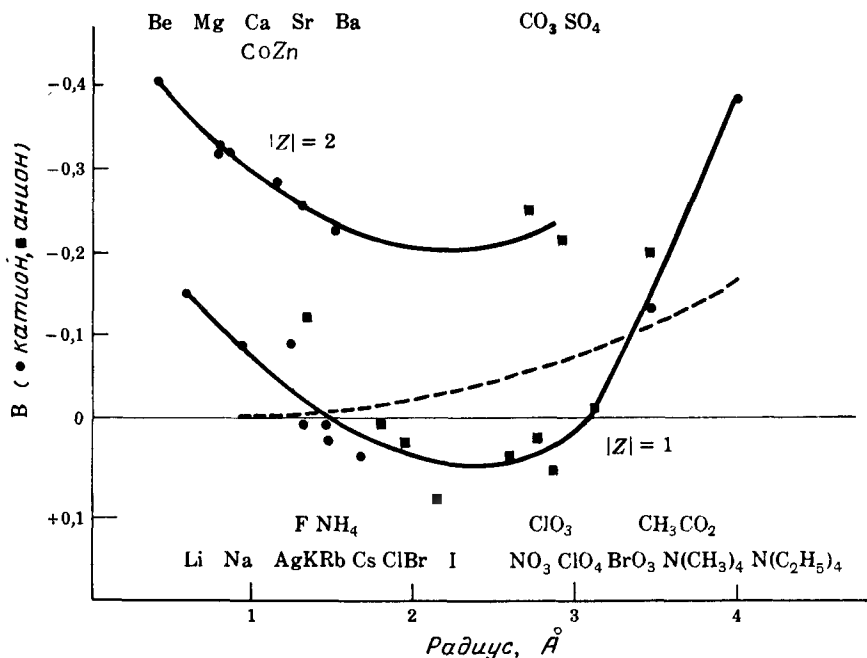


Р и с. 10. Влияние ионов на структуру воды по Франку и др. [55]. Молекулы воды внутри точечной окружности образуют плотную гидратную оболочку иона; внутри штриховых окружностей находятся области воды, дополнительно разупорядоченной под действием иона; в основной массе растворителя некоторые молекулы ориентированы в «кластерах».

ей величину — текучесть); влияние на коэффициент B в уравнении Джонса — Доула

$$\eta = \eta_0 (1 + A \sqrt{c} + Bc), \quad (10)$$

где относительно слабое влияние межионных электростатических сил на вязкость выделено в виде члена, содержащего коэффициент A ; влияние на температурный коэффициент вязкости, отражающий увеличение «структурированности» воды при низких температурах (при данной температуре деструктурирующий ион должен увеличивать вязкость) [56, 59]. Как и для других параметров, существует некоторая неопределенность в промежуточных случаях;



Р и с. 11. Влияние ионов на вязкость воды в зависимости от их кристаллографических радиусов [58]. Значения B найдены из текучести — величины обратной вязкости.

в крайних случаях последовательность ионов по их эффективности и направление эффектов определяются вполне четко. Влияние соли можно представить в виде суммы эффектов, вызываемых образующими ее ионами, исходя из некоторых предположений об относительной эффективности анионов и катионов данного размера. Данные по влиянию некоторых отдельных ионов на структуру воды собраны в табл. 4 [28, 56, 60]. Самые небольшие ионы, литий и фторид, являются структурирующими благодаря сильному электростатическому взаимодействию с окружающими молекулами воды; в то же время большие ионы цезия, бромиды и иодиды деструктурируют воду. По данным большинства вискозиметрических критериев ионы еще больших размеров, такие, как тетраэтиламмоний, структурируют воду [59, 60].

Разупорядочивающий эффект ионов должен непосредственно проявляться в энтропии растворения. При сравнении величин энтропии возникает проблема выбора подходящих единиц, чтобы сравнение производилось при одинаковых стандартных состояниях. Наиболее удовлетворительным для этой цели является использование парциальных мольных энтропий. Как видно из табл. 4 [56], они указывают на тот же характер изменения воздействий ионов на структуру воды, что и данные по вязкости. Влияние солей на

Таблица 4

Влияние ионов на структуру воды [28, 56, 60]

Ион	Коэффициент вязкости В	Парциальная молярная энтропия, энтр. ед.	Самодиффузия воды
Li ⁺	0,15	-8,8	-0,11
Na ⁺	0,08	0,5	-0,08
K ⁺	-0,01	10,7	-0
Cs ⁺	-0,05	18,3	-0,01
(CH ₃) ₄ N ⁺	0,14		
(C ₂ H ₅) ₄ N ⁺	0,39		
(C ₃ H ₇) ₄ N ⁺	1,09		
(C ₄ H ₉) ₄ N ⁺	1,40		
F ⁻	0,10		-0,11
Cl ⁻	-0,01	11,0	0
Br ⁻	-0,04	17,1	0,07
I ⁻	-0,08	22,8	0,08

коэффициент самодиффузии воды четко коррелирует с влиянием на текучесть (величину, обратную вязкости) [28, 61].

Возвращаясь к вопросу, в какой степени такое явление, как высаливание, можно приписать непосредственно влиянию солей на структуру воды, необходимо подчеркнуть важность установления внутренне непротиворечивой причинно-следственной связи между этими явлениями, которая сохраняется в широком ряду солей. Следует избегать искушения давать «объяснения», основанные на констатации *post facto*, которые можно легко построить почти в любом случае для небольшого числа солей. Так, более слабое высаливание под действием больших анионов по сравнению с малыми структурирующими ионами в той же концентрации можно приписать деструктурирующему эффекту больших ионов, которые, разрушая структуру воды, облегчают внесение неполярных молекул в раствор. Однако с таким же успехом можно объяснить всаливающий эффект больших тетраалкиламмониевых ионов, например иона тетраэтиламмония, их структурирующим действием на воду. Увеличение структурированности воды в присутствии такого иона или при добавлении относительно неполярных веществ, таких, как спирт или диоксан, должно облегчить образование оболочки структурированной воды вокруг неполярной молекулы, которая может делить структурированный слой воды с ионом или органическим компонентом раствора. Но это объяснение предполагает противоположное предыдущему влияние на структуру воды, а также сталкивается с некоторыми трудностями в случае иона тетраметиламмония. Этот ион является, согласно по крайней мере нескольким критериям [59, 62], деструктурирующим, однако он всаливает бензол лишь немного слабее, чем большие тетраалкиламмониевые ионы (табл. 3, рис. 4).

Легкость, с которой в водном растворе происходит взаимная компенсация изменений внутренней энергии и энтропии с небольшим суммарным изменением свободной энергии, наводит на мысль, что изменения в структуре воды могут происходить как *вторичные* явления, сопровождающие более фундаментальные изменения в природе раствора. Важнейшей проблемой в исследовании влияния ионов на поведение растворенных в воде веществ является установление природы изменений, непосредственно проявляющихся в свободной энергии системы. Как меньшую высаливающую способность деструктурирующих ионов иодида и перхлората по сравнению с фторидом и хлоридом, так и всаливающее действие тетраалкиламмониевых ионов всех размеров

можно объяснить с точки зрения влияния этих ионов на плотность когезионной энергии или на внутреннее давление раствора без привлечения представлений об их структурирующем действии (табл. 3). Корреляция между изменениями в структуре воды и влиянием концентрированных растворов солей на белки и пептиды наблюдается в ограниченном ряду солей, но нарушается при рассмотрении большего числа солей, откуда следует, что между этими явлениями нет простой причинно-следственной связи; менее детальное, но более успешное объяснение этих эффектов можно предложить на основании изучения влияния концентрированных растворов солей на соединения, служащие моделями составных частей макромолекул [8, 63].

Примерами взаимной компенсации изменений энтропии и энтальпии в водных растворах могут служить термодинамические параметры и коэффициенты активности в растворах солей. Возрастание концентрации хлоридов тетрапропиламмония и тетрабутиламмония сопровождается большими взаимно компенсирующимися изменениями энтропии и энтальпии и лишь незначительными изменениями свободной энергии [64]. Тенденция воды к вытеснению из молярных растворов NaCl, NaBr и NaI почти одинакова, как следует из коэффициентов активности воды в этих растворах, равных 0,967, 0,966 и 0,965 соответственно, в то время как структура воды в этих трех растворах совершенно различна, как следует из ряда параметров. Если каждый ион изменяет взаимное расположение и энтропию только шести молекул воды, действию соли подвергаются $12/55$ всех молекул воды, и должно происходить изменение свободной энергии, если изменения энтропии не будут скомпенсированы изменениями энтальпии. Одинаковость свободной энергии воды в этих трех растворах, вероятно, является результатом уравнивания благоприятного изменения энтальпии при такой ориентации молекул воды, когда образуется максимальное число водородных связей, и неблагоприятного изменения энтропии, возникающего в результате ограничения свободного движения молекул при образовании этих водородных связей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harned H. S., Owen B. B., The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions, 3d ed., Reinhold Publishing Corporation, New York, 1958; Робинсон П. А., Стокс П. Г., Растворы электролитов, М., 1963; Edsall J. T., Wyman J., Biophysical Chemistry, vol. 1, Academic Press Inc., New York, 1958; Gurney R. W., Ionic Processes in Solution, McGraw-Hill Book Company, New York, 1953.
2. Wilson I. B., in «The Enzymes», (Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. eds.), vol. 4, Academic Press Inc., New York, 1960, p. 501; Wilson I. B., Bergmann F., J. Biol. Chem., 185, 479 (1950).
3. Krupka R. M., Biochemistry, 5, 1988 (1966).
4. Fridovich I., J. Biol. Chem., 238, 592 (1963).
5. Steinhardt J., Fugitt C. H., Harris M., J. Res. Natl. Bur. Std., 28, 201 (1942).
6. Peterson S., Ann. N.Y. Acad. Sci., 57, 144 (1954); Gregor H. P., Belle J., Marcus R. A., J. Am. Chem. Soc., 77, 2713 (1955).
7. Bello J., Reise H. C. A., Vinograd J. R., J. Phys. Chem., 60, 1299 (1956); von Hippel P. H., Wong K-Y., Biochemistry, 1, 664 (1962).
8. Robinson D., Jenks W. P., J. Am. Chem. Soc., 87, 2462, 2470 (1965).
9. Scatchard G., Black E. S., J. Phys. Chem., 53, 88 (1949); Scatchard G., Wu Y. V., Shen A. L., J. Am. Chem. Soc., 81, 6104 (1959).
10. Kay R. L., J. Am. Chem. Soc., 82, 2099 (1960); Fuoss R. M., Hsia K-L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1550 (1967).
11. Denney T. O., Monk C. B., Trans. Faraday Soc., 47, 992 (1951).
12. Letsinger R. L., Savereide T. J., J. Am. Chem. Soc., 84, 114, 3122 (1962).
13. Overberger C. G., Pierre T. St., Vorchheimer N., Yaroslavsky S., J. Am. Chem. Soc., 85, 3514 (1963).
14. Painter T. J., J. Chem. Soc., 1962, 3932.
15. Olson A. R., Simonson T. R., J. Chem. Phys., 17, 1167 (1949); Davies C. W., in «Progress in Reaction Kinetics» (Porter G., ed.), vol. 1, Pergamon Press, New York, p. 161; Marburg S., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 232 (1962); Kershaw M. R., Prue J. E., Trans. Faraday Soc., 63, 1198 (1967).

16. Von Hippel P. H., Wong K-Y., Science, **145**, 577 (1964).
17. Hofmeister F., Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., **24**, 247 (1888); McBain J. W., Colloid Science, Reinhold Publishing Corporation, chap. 9, New York, 1950.
18. Voet A., Trans. Faraday Soc., **32**, 1301 (1936); Chem. Rev., **20**, 169 (1937).
19. Burk N. F., J. Phys. Chem., **47**, 104 (1943).
20. Simpson R. B., Kauzmann W., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5139 (1953).
21. Wolff J., J. Biol. Chem., **237**, 230 (1962).
22. Nagy B., Jenks W. P., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2480 (1965).
23. Warren J. C., Stowring L., Morales M. F., J. Biol. Chem., **241** 309 (1966).
24. Hamaguchi K., Geiduschek E. P., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1329 (1962).
25. Long F. A., McDevitt W. F., Chem. Rev., **51**, 119 (1952).
26. Green A. A., J. Biol. Chem., **93**, 495 (1931).
27. Glueckauf E., Trans. Faraday Soc., **60**, 1637 (1964).
28. McCall D. W., Douglass D. C., J. Phys. Chem., **69**, 2001 (1965).
29. Conway B. E., Ann. Rev. Phys. Chem., **17**, 481 (1966).
30. Halliwell H. F., Nyburg S. C., J. Chem. Soc., **1960**, 4603.
31. Nancollas G. H., Interactions in Electrolyte Solutions, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966, p. 118.
32. Buckingham A. D., Discussions Faraday Soc., **24**, 151 (1957); Halliwell H. F., Nyburg S. C., Trans. Faraday Soc., **59**, 1126 (1963).
33. Friedman H. L., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5 (1952).
34. Eigen M., Discussions Faraday Soc., **24**, 25 (1957); Atkinson G., Kor S. K., J. Phys. Chem., **71**, 673 (1967).
35. Davies C. W., Ion Association, Butterworth & Co. (Publishers), Ltd., London, 1962, p. 77.
36. Diamond R. M., J. Phys. Chem., **67**, 2513 (1963); Evans D. F., Kay R. L., *ibid.*, **70**, 366 (1966).
37. Whitney D. C., Diamond R. M., J. Inorg. Nucl. Chem., **24**, 1405 (1962).
38. Rosseinsky D. R., J. Chem. Soc., 1962, 785.
39. Eisenman G., in «Membrane Transport and Metabolism» (Kleinzelzer A., Kotyk A., eds.), Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1961, p. 163; in «Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation», (Reilly C. N., ed.), vol. 4, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1965, p. 213, Biophys. J., **2**, Pt. 2, 259 (1962).
40. Adamson A. W., J. Am. Chem. Soc., **76**, 1578 (1954); Parry R. W., in «The Chemistry of the Coordination Compounds» (Bailar J. C., Jr., ed.), Reinhold Publishing Corporation, New York, 1956, p. 220.
41. Westheimer F. H., Ingraham L. L., J. Phys. Chem., **60**, 1668 (1956).
42. Frumkin A., Z. Physik. Chem. (Leipzig), **109**, 34 (1924); Frumkin A., Reichstein S., Kulvarskaja R., Kolloid-Z., **40**, 9 (1926); Randles J. E. B., Discussions Faraday Soc., **24**, 194 (1957); Evans A. W., Trans. Faraday Soc., **33**, 794 (1937).
43. Devanathan M. A. V., Tilak B. V. K. S. R. A., Chem. Rev., **65**, 635 (1965); Grahame D. C., *ibid.*, **41**, 441 (1947).
44. Evans A. W., Trans. Faraday Soc., **33**, 794 (1937).
45. Deno N. C., Spink C. H., J. Phys. Chem., **67**, 1347 (1963).
46. Conway B. E., Desnoyers J. E., Smith A. C., Phil. Trans. Roy. Soc. (London), A **256**, 389 (1964).
47. Grunwald E., Winstein S., J. Am. Chem. Soc., **70**, 841 (1948).
48. Kosower E. M., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3253 (1958).
49. McDevitt W. F., Long F. A., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1773 (1952).
50. Antonini E., Wyman J., Bucci E., Fronticelli C., Rossi-Fanelli A., J. Mol. Biol., **4**, 368 (1962); Kawahara K., Kirshner A. G., Tanford C., Biochemistry, **4**, 1203 (1965).
51. Robinson D. R., Grant M. E., J. Biol. Chem., **241**, 4030 (1966).
52. Davidson J., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc. (to be published).
53. Guidotti G., J. Biol. Chem., **242**, 3685 (1967).
54. Bernal J. D., Fowler R. H., J. Chem. Phys., **1**, 515 (1933).
55. Frank H. S., Evans M. W., J. Chem. Phys., **13**, 507 (1945); Frank H. S., Wein W-Y., Discussions Faraday Soc., **24**, 133 (1957).
56. Gurney R. W., Ionic Processes in Solution, McGraw-Hill Book Company, New York, 1953.
57. Kavanau J. L., Water and Solute-Water Interactions, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1964.
58. Podolsky R. J., J. Am. Chem. Soc., **80**, 4442 (1958).
59. Kay R. L., Vituccio T., Zawoycki C., Evans D. F., J. Phys. Chem., **70**, 2336 (1966).
60. Nightingale E. R., Jr., J. Phys. Chem., **66**, 894 (1962).
61. Wang J. H., J. Phys. Chem., **58**, 686 (1954).
62. Boyd G. E., Chase J. W., Vaslow F., J. Phys. Chem., **71**, 573 (1967); Wood R. H., Anderson H. L., *ibid.*, p. 1874.
63. Jencks W. P., Fed. Proc., **24**, S-50 (1965).
64. Lindenbaum S., J. Phys. Chem., **70**, 814 (1966).

ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Межмолекулярные взаимодействия заряженных и полярных и некоторых нейтральных молекул в растворах, как правило, обеспечиваются электростатическими силами, водородной связью или переносом заряда. Однако в водном растворе эти типы взаимодействий малоэффективны (гл. 6, 7 и 9) ввиду высокой сольватирующей способности молекул воды, прочности образуемых ими водородных связей и слабости обычных взаимодействий с переносом заряда в основном состоянии. Чтобы объяснить большие энергии связывания, обнаруживаемые для фермент-субстратного взаимодействия, и связывания малых молекул с белками часто необходимо учитывать еще один тип взаимодействия, который за неимением точного термина условно назовем «гидрофобной связью». «Гидрофобные силы», вероятно, являются наиболее важным фактором, обеспечивающим нековалентное межмолекулярное взаимодействие в водном растворе. Свободные энергии связывания субстратов и ингибиторов с активными центрами ферментов часто равны примерно -10 ккал/моль ($-42 \cdot 10^3$ Дж/моль) и менее, причем лишь небольшую долю этой величины можно отнести за счет других типов взаимодействия. Сила и специфичность связывания малых молекул белками видны особенно четко при взаимодействии гаптенов с антителами, движущей силой которого обычно является гидрофобное взаимодействие. Свободная энергия связывания 8-динитрофениллизина специфическим для него антителом, которая почти полностью обусловлена взаимодействием с динитрофенильной группой, приблизительно равна -12 ккал/моль ($-50 \cdot 10^3$ Дж/моль), а энергии связывания малых слабополярных гаптенов обычно лежат в интервале от -5 до -10 ккал/моль (от -21 до $-42 \cdot 10^3$ Дж/моль) [1, 2].

Понятия «гидрофобная связь», «аполярная связь», «неполярная связь» могут ввести в заблуждение, потому что они не относятся к действительно существующей химической связи в обычном смысле между взаимодействующими молекулами. Более того, большинство взаимодействий, к которым применялись эти понятия, осуществляется между молекулами, обладающими существенной растворимостью в воде и содержащими сильнополярные группы. Однако другие термины еще менее удовлетворительны, так как они предполагают какой-то конкретный механизм взаимодействия. С феноменологической точки зрения гидрофобное связывание в общем можно определить как такое взаимодействие между молекулами, которое является более сильным, чем взаимодействие этих молекул с водой, и которое не может быть обусловлено ковалентной или водородной связью, электростатическим притяжением или переносом заряда. Это определение не подразумевает никакого конкретного механизма взаимодействия.

Примеры взаимодействий, относящихся к этому общему типу, будут описаны в первом разделе данной главы, причем обсуждению возможных конкретных механизмов будет уделено минимальное внимание. Во втором разделе будет сделана попытка качественно рассмотреть эти явления с точки зрения структуры и свойств воды. Будет также обсужден постоянно возникающий вопрос о том, каким образом лучше описывать такие взаимодействия: с точки зрения притяжения между молекулами растворенного вещества или исходя из невыгодности их контакта с растворителем. В последнем разделе

понятие «гидрофобность» будет использовано в более узком смысле для описания взаимодействий, возникающих из-за большой энергии сцепления связанных водородной связью молекул воды, вследствие чего менее полярные молекулы стремятся сблизиться независимо от наличия или отсутствия фактических сил притяжения между ними. Если взаимодействие сопровождается понижением энтропии и «структурированием» растворителя, оно соответствует классической модели гидрофобного взаимодействия, но надо все же допустить, что изменения в структуре растворителя являются вторичными и механизм взаимодействия в основе своей не зависит от их наличия или отсутствия.

А. ПРИМЕРЫ

1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ

Часто обнаруживают, что большие ионы сильно взаимодействуют между собой в водном растворе, в то время как ионы меньших размеров с теми же заряженными группами взаимодействуют слабее или вообще не взаимодействуют. Взаимодействующие ионы можно разделить на два различных, но связанных между собой класса. К первому классу относят большие симметричные ионы, заряд которых экранирован от воды и которые взаимодействуют между собой сильнее, чем с молекулами воды, как это обсуждалось в предыдущей главе. Ко второму классу относят ионы, в которых заряженная группа присоединена к гидрофобной, и взаимодействие последней с макромолекулой или другими ионами обеспечивает их связывание. К этому классу относят красители и ионные детергенты, которые связываются с гидрофобными участками белков и могут вызывать их денатурацию, солюбилизируя внутренние гидрофобные группы белковой глобулы. Связывание с белками в ряду замещенных анионов соответствующей структуры возрастает с увеличением размера заместителей и почти не зависит от индукционных эффектов [3]. Также часто обнаруживают, что заряженные молекулы красителей, которые могут участвовать в некотором типе гидрофобного взаимодействия, связываются стехиометрически с противоположно заряженными группами белков, хотя небольшие ионы в тех же условиях практически не взаимодействуют с такими группами.

Одним из примеров такого типа взаимодействий между простыми молекулами, который допускает более или менее количественное рассмотрение (табл. 1), является изученное кондуктометрически образование ионных пар

Таблица 1

Константы равновесия образования ионных пар в воде при 25 °C [4]

Анион	Катион	$K_{\text{ассос}}$, л/г-ион	$\Delta F_{\text{ассос}}^{\circ}$, ккал/моль
$\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3^-$	$\text{Me}_3\text{N}^{+}\text{-}n\text{-Bu}$	< 3	< 1
$\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3^-$	$\text{Me}_3\text{N}^{+}\text{C}_{10}\text{H}_{21}$	7,1	1,8
$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{SO}_3^- \text{ }^a$	$\text{Me}_3\text{N}^{+}\text{-}n\text{-Bu}$	5,5	1,7
$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{SO}_3^- \text{ }^a$	$\text{Me}_3\text{N}^{+}\text{C}_{10}\text{H}_{21}$	42 000	8,4

^a Азобензол-4-сульфонат

в рядах сульфонов и ионов алкиламмония. Ионные пары, образованные относительно большими ионами бензолсульфоната и триметилбутиламмония, неустойчивы в воде, но образование ионных пар становится заметным,

если ввести азобензольную группу в сульфонат или длинную углеводородную цепь в алкиламмоний; наконец, очень устойчивые ионные пары с константой диссоциации, соответствующей свободной энергии связывания $-8,4$ ккал/моль ($-35,3 \cdot 10^3$ Дж/моль), образуются между ионами азобензол-4-сульфоната и децилтриметиламмония [4]. Образование этих ионных пар может быть обусловлено как гидрофобным взаимодействием между неполярными группами, так, естественно, и прямым электростатическим взаимодействием между зарядами, находящимися в среде с низкой диэлектрической проницаемостью, создаваемой экранирующими углеводородными группами.

Хорошо известны отклонения от закона Бера, обнаруживаемые у многих красителей при сравнительно низких концентрациях в воде вследствие димеризации или образования более крупных агрегатов; если бы это объяснялось взаимодействием π -электронных систем молекул красителей, должны были бы наблюдаться большие спектральные изменения (метахромазия) при их агрегации [5]. Следует отметить, что: 1) агрегироваться могут молекулы катионных красителей, таких, как цианины, несмотря на возникающее электростатическое отталкивание; 2) агрегация нейтральных или заряженных молекул красителей обычно прекращается или сильно подавляется в неводных растворителях, таких, как этанол, и 3) величина ΔH агрегации красителей отрицательна [6]. Низкие концентрации красителя, при которых происходит ассоциация, указывают на большие изменения свободной энергии при взаимодействии его молекул; при этом значения ΔF , примерно равные -10 ккал/моль ($-42 \cdot 10^3$ Дж/моль), не являются исключением [7].

2. ОСНОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Основания нуклеиновых кислот, несмотря на их большие дипольные моменты, гидрофобны. Действительно, их растворимость в воде обычно мала (т. е. взаимодействие их молекул между собой в твердой фазе сильнее, чем с молекулами воды) и возрастает при добавлении к воде таких веществ, как спирты, которые повышают растворимость гидрофобных соединений в воде. Растворимость аденина в воде возрастает с увеличением углеводородного заместителя в добавляемых спиртах, амидах, мочевилах и карбаматах, причем солибилизирующая способность коррелирует с ростом денатурирующей способности этих соединений в качестве денатурирующих агентов для ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) [8]. Таким образом, одним из факторов, способных вызывать денатурацию ДНК, является такое изменение в природе растворителя, при котором он начинает предпочтительно взаимодействовать с основаниями нуклеиновых кислот, становящимися при денатурации более доступными. Это подтверждается экспериментально повышением растворимости и понижением коэффициента активности оснований нуклеиновых кислот в таких растворителях.

Растворимость оснований нуклеиновых кислот возрастает также в присутствии других оснований (рис. 1). Для данного основания коэффициент активности понижается с ростом концентрации, из чего можно заключить,

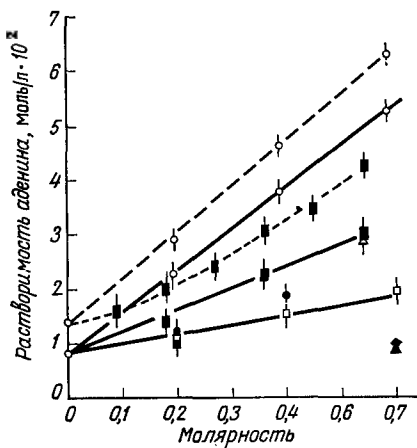


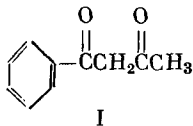
Рис. 1. Растворимость аденина в присутствии: пурина $\circ$, уридина $\blacksquare$, цитидина $\triangle$, пириимидина $\square$, фенола $\bullet$, циклогексанола $\blacksquare$, мочевины $\blacktriangle$ и адонитола $\blacklozenge$ при 25,5 (—) и 38 °C (.....) [9].

что взаимодействие происходит и между молекулами самого основания [9]. Тот факт, что изменения в растворимостях и коэффициентах активности существенны уже при относительно низких концентрациях (в наиболее благоприятных случаях $\sim 0,1$ моль/л), указывает на то, что они вызваны скорее прямым взаимодействием между молекулами, чем неспецифическим влиянием на растворитель. Важные доказательства этого были получены при наблюдении сдвигов в спектрах ЯМР протонов кольца оснований при возрастающих концентрациях последних [10]. Константы ассоциации, вычисленные из данных по растворимости и коэффициентов активности (типа приведенных на рис. 1), успешно объясняют зависимость положения сдвигов в спектрах ЯМР от концентрации. Эти константы не очень велики (~ 5 л/моль для взаимодействия аденин — цитозин и 1 л/моль для тимин — урацил), но они указывают на то, что молекулы оснований взаимодействуют между собой существенно сильнее, чем с молекулами воды, присутствующими в большом избытке (55 моль/л). Неблагоприятное изменение энтропии ассоциации отдельных молекул в разбавленном растворе значительно меньше для оснований, которые связаны с ковалентным остовом цепи нуклеиновой кислоты. Поэтому почти несомненно, что механизм, который ответствен за взаимодействие отдельных молекул основания, является главным фактором, обеспечивающим устойчивость простой или двойной спирали полинуклеотида в водном растворе. Так как детали механизма этого взаимодействия окончательно не установлены, его принято характеризовать неопределенным термином «стекинг».

Маловероятно, чтобы водородная связь в водном растворе могла обеспечить стабильность нативных нуклеиновых кислот, и действительно, было показано, что устойчивость простой спирали полицитидиловой кислоты не изменяется в присутствии формальдегида, который связывается с основаниями нуклеотидов и должен понижать или исключать стабилизацию межмолекулярной водородной связью [11]. Основная роль водородных связей в полинуклеотидах заключается в обеспечении специфичности, т. е. в определении того, какое взаимодействие основание — основание стерически разрешено и энергетически наиболее выгодно в структуре двойной спирали, которая удерживается за счет стекинга.

3. ВЛИЯНИЕ НА СКОРОСТИ РЕАКЦИЙ

Существует ряд примеров увеличения скорости простых реакций, которое вызвано сближением реагентов под влиянием гидрофобного взаимодействия. Каталитическая активность β -фенилпропионовой кислоты в общекислотном катализе енолизации бензоилацетона (I) приблизительно

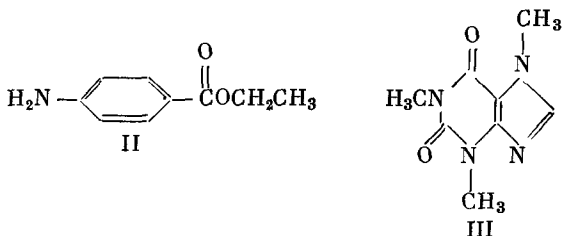


в три раза больше, чем следует ожидать при сравнении с активностью кислот примерно той же силы, но с более короткой боковой цепью, хотя каталитическая активность этой кислоты в процессе енолизации ацетилацетона нормальная. Интересно, что это увеличение каталитической активности было объяснено Беллом и сотрудниками в 1949 г. сближением катализатора и субстрата, которое происходит главным образом благодаря выталкиванию гидрофобных молекул из среды сильно взаимодействующих между собой молекул воды в одну полость, т. е. что взаимодействие скорее является следствием взаимного притяжения молекул растворителя, чем притяжения растворенных молекул [12, 13].

Подобные явления наблюдаются при ускорении щелочного гидролиза метилнафтоата большими катионами, такими, как ион тетрабутиламмония, который, по-видимому, взаимодействует с субстратом и облегчает его атаку гидроксил-ионом; добавление больших анионов, таких, как тетрафенилборат, приводит к понижению скорости. Это взаимодействие авторы объяснили дисперсионными силами Ван-дер-Ваальса — Лондона между ионом и субстратом [14].

Более значительное увеличение скорости, вызываемое гидрофобным взаимодействием, было найдено при сравнении аминлиза *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и декановой кислот этиламино и дециламино [15]. После поправки на гидролиз и на 30-кратное уменьшение реакционной способности эфира с более длинной цепью по сравнению с ацетатом (что следует из сравнения скоростей реакций с этиламино и, по-видимому, вызвано стерическими препятствиями) найдено увеличение скорости приблизительно в 100 раз в реакции дециламина с эфиром декановой кислоты по сравнению с ацетатом. Это ускорение можно объяснить сближением реагентов за счет гидрофобного взаимодействия углеводородных цепей. Увеличение скорости не является результатом мицеллообразования, потому что скорость имеет первый порядок по концентрации амина и ускорение наблюдается при его концентрациях значительно ниже критической концентрации мицеллообразования.

Гораздо чаще связывание добавляемых молекул приводит к *понижению* скорости. Ингибирование гидролиза бензокаина [этил-*n*-аминобензоата (II)] кофеином (III) — один из наиболее известных примеров



Эфир и ингибитор ассоциируют в воде с константой связывания приблизительно 60 л/моль, и уменьшение скорости гидролиза в присутствии кофеина пропорционально убыли концентрации свободного эфира, откуда следует, что скорость гидролиза комплекса мала по сравнению со скоростью гидролиза свободного эфира [16].

4. ОЦЕНКА ВЕЛИЧИНЫ ГИДРОФОБНЫХ СИЛ

Простейшей и наиболее непосредственной моделью гидрофобного связывания является перенос соединения из водного раствора в другую фазу, которой может быть как само изучаемое соединение в жидком состоянии, так и любая другая неводная фаза. Свободная энергия этого переноса, вычисленная из коэффициентов распределения между двумя фазами или в случае жидкого соединения, по данным растворимости дает грубую оценку свободной энергии, ожидаемой для гидрофобного взаимодействия с участием этого соединения. Так, связывание ряда углеводов с сывороточным альбумином и ряда углеводородных ингибиторов с активным центром химотрипсина в каждом случае обратно пропорционально растворимости этих углеводов в воде [17, 18]. Зависимость логарифма растворимости от энергии связывания свидетельствует о том, что изменения в структуре углеводорода влияют на его энергию связывания с сывороточным альбумином приблизительно вдвое слабее, чем на растворимость, в то время как в случае ингибиторов химотрипсина влияние на ингибирующую способность и растворимость почти

одинаково. На этом основании можно создать довольно ориентировочно следующую картину процесса связывания: в случае альбумина половина связанной молекулы переходит из водного окружения в неполярное, а другая половина продолжает контактировать с водой; в случае же химотрипсина происходит перенос всей молекулы ингибитора в неводную «фазу».

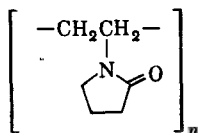
Имеется множество данных по свободным энергиям переноса малых молекул из воды в неводные растворители, такие, как изобутанол, гексан, эфир и бензол [19]. Параметр гидрофобности π , который служит мерой возможной энергии гидрофобного связывания для данного соединения, был определен из коэффициентов распределения между водой и октанолом [20]. По физико-химическому смыслу π аналогичен параметру σ для полярных эффектов. Наклон зависимости логарифмов констант связывания от π для ряда соединений является мерой того, в какой степени процесс связывания близок переносу из воды в октанол; например, наклон такой зависимости для связывания с гемоглобином равен 0,7.

Из различных измерений следует, что в среднем свободная энергия $-\Delta F$, которую можно получить при переносе неразветвленной углеводородной цепи из воды в неполярный растворитель, возрастает приблизительно на 0,8 ккал/моль ($3,36 \cdot 10^3$ Дж/моль) на каждую дополнительную метиленовую группу. Эта величина основана на данных по растворимости в воде спиртов, углеводородов и жирных кислот, образованию неионных мицелл и димеризации анионов жирных кислот. Следует отметить, что она мало зависит от длины цепи вплоть до 12 и в некоторых случаях до 16 атомов углерода [21—23]. (Из недавних исследований растворимости алифатических углеводородов следует, однако, что инкремент для длинной цепи у этих соединений постоянен [24].) Для молекулы бензола свободная энергия переноса из воды в бензол составляет около -5 ккал/моль ($-21 \cdot 10^3$ Дж/моль). Эта же величина пригодна для оценки энергии переноса бензольной группы из воды в углеводородную область белка.

Данные подобного рода можно также использовать для оценки вклада гидрофобных сил в энергию стабилизации макромолекулы. Полагая, что внутренняя часть белковой глобулы менее гидрофобна, чем чистый углеводород или высший алифатический спирт, и в среднем соответствует гидрофобности этанола, Тенфорд использовал свободные энергии переноса боковых цепей аминокислот из этанола в воду для оценки вклада гидрофобных сил в энергию стабилизации белковой глобулы [25]. На основании этой модели свободная энергия связывания возрастает примерно на 0,7 ккал/моль ($2,9 \cdot 10^3$ Дж/моль) на каждую дополнительную метиленовую группу и на 2 ккал/моль ($8,4 \cdot 10^3$ Дж/моль) на каждое бензольное или индольное кольцо.

Повышение растворимости одного соединения при добавлении к растворителю другого соединения можно объяснить как неспецифическим влиянием на коэффициент активности, так и образованием комплекса между двумя соединениями. Систематизация констант равновесия комплексообразования (большинство из которых было получено по данным о солюбилизации при достаточно низких концентрациях, когда большие изменения коэффициентов активности маловероятны) может стать ценным источником для определения величин энергий взаимодействия, которые можно ожидать у соединений разных классов [26].

Связывание ряда простых ароматических молекул с поливинилпирролидоном (IV) — растворимым в воде полимером с углеводородным остовом



IV

и циклическими третичными амидными группами в боковых цепях — один из примеров связывания простых молекул в водном растворе полимерами известной структуры [27] (табл. 2).

Таблица 2

Связывание малых молекул с поливинилпирролидоном в воде при 30° [27]

Соединение	$K_{\text{ассос'}}$ л/моль	ΔF , ккал/моль	ΔS , энтр. ед.	ΔH , ккал/моль
Бензол	3,5	—1,1	18	2,4
Бензойная кислота	3,0	—2,1	12	—1,0
Фенол	14,5	—1,6	15	0,5
2-Нафтол	120	—2,9	12	—1,7

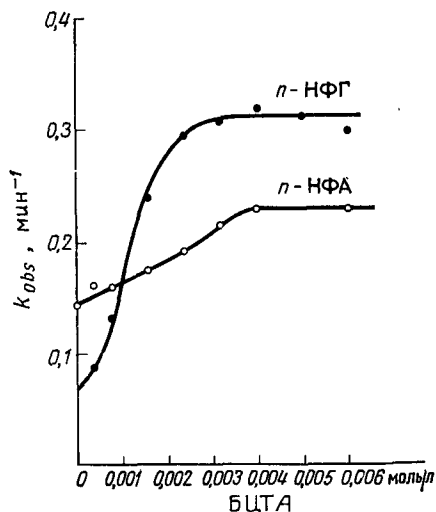
Этот процесс моделирует связывание малых молекул белками. Зависимость степени связывания от концентрации свидетельствует о том, что существует один связующий центр на приблизительно каждые 10 остатков пирролидона и свободная энергия связывания составляет от —1 до —2 ккал/моль (от —4,2 до $-8,4 \cdot 10^3$ Дж/моль) на одно ароматическое кольцо, причем связывание несколько возрастает при введении полярных заместителей. Взаимодействие малой молекулы с полимером в основном осуществляется за счет положительного изменения энтропии, которого достаточно для того, чтобы скомпенсировать невыгодные изменения — положительное изменение энтальпии, наблюдавшееся для некоторых соединений, и отрицательное изменение энтропии, которым должны сопровождаться сжатие полимера и ассоциация. То, что полимер подвергается сжатию при связывании незаряженных малых молекул, следует из измерений светорассеяния и понижения вязкости. Это явление моделирует конформационные изменения в белках, происходящие при связывании малых молекул.

5. МИЦЕЛЛЫ

Мицеллы — это наиболее хорошо известный и наиболее интенсивно изучаемый пример действия гидрофобных сил в водном растворе. Многие современные работы, посвященные природе этих сил, тесно связаны с ранними исследованиями в области коллоидной химии мицелл [28]. При образовании мицелл углеводородные цепи дифильных молекул поверхностноактивных веществ ассоциируют таким образом, чтобы иметь минимальную площадь поверхности соприкосновения с водой. Гидрофильные группы, которые могут быть как ионогенными, так и неионогенными, стремятся при этом сохранить контакт с растворителем и остаются на поверхности мицеллы. Добавление таких веществ, как спирты, которые увеличивают растворимость неполярных соединений в воде, приводит к разрушению мицелл, делая контакт гидрофобной области с растворителем энергетически более благоприятным. Это проявляется в возрастании критической концентрации мицеллообразования в присутствии таких веществ. Их добавление главным образом в случае ионных мицелл понижает высокую плотность заряда на поверхности мицеллы, что также способствует разрушению мицелл. Вследствие сложного влияния заряженных групп на свойства мицелл легче сделать определенные выводы, исследуя скорее поведение неионных, чем ионных детергентов.

Удивительно полная аналогия обнаруживается при сравнении структуры и свойств мицелл и глобулярных белков, включая ферменты. Рентгенографические исследования показали, что в глобулярных белках гидрофобные боковые цепи аминокислот обращены внутрь глобулы, в то время как заряженные и другие гидрофильные группы локализуются на поверхности,

сохраняя контакт с растворителем [29]. Добавление органического вещества к раствору белка, так же как и в случае мицелл, делает более благоприятным контакт гидрофобных групп с растворителем. Таким образом, понижается свободная энергия переноса группы к растворителю, что вносит основной вклад в изменение свободной энергии при денатурации белка спиртами, ацетоном и другими подобными соединениями. Температурная зависимость и термодинамические параметры денатурации рибонуклеазы в водно-этанольных смесях такие же, как и при процессах растворения неполярных молекул [30]. (Интересно, что при низкой температуре и низкой концентрации спирта происходит стабилизация белка, что можно сопоставить с понижением растворимости аргона в тех же условиях; это может отражать конкуренцию между молекулами этанола и неполярными группами за ограниченное число пустот в растворителе.)



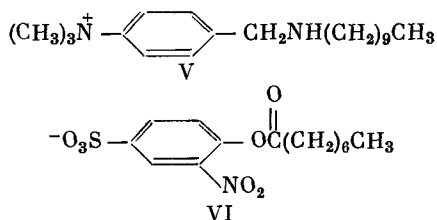
Р и с. 2. Увеличение скорости гидролиза *n*-нитрофеноловых эфиров уксусной (○) и капроновой (●) кислот в присутствии катионного детергента бромистого цетилтриметиламмония (БЦТА) при pH 10,07 и 25 °C [37].

низма действия обеспечивают высокую эффективность этих соединений как денатурирующих агентов на различные типы макромолекул. Их можно различить при исследовании влияния алкилирования на денатурирующую способность мочевины и гуанидинов, так как алкилирование увеличивает эффективность этих соединений при сольбилизации неполярных молекул и оснований нуклеиновых кислот [8, 34, 35].

Можно продолжить аналогию между мицеллами и белками на том основании, что в определенных реакциях мицеллы обнаруживают каталитическую активность, причем воспроизводят ряд характерных черт ферментативного катализа. В большинстве случаев катализатором является мицелла ионного детергента, которая концентрирует субстрат на поверхности и вызывает ускорение, если переходное состояние реакции имеет заряд, противоположный заряду мицеллы [36, 37]. Если переходное состояние заряжено одноименно или вообще не заряжено, обычно наблюдают уменьшение скорости, так как концентрирование реагентов в мицелле уменьшает их доступность для молекул воды. Следовательно, реакции, в которых вода является реагентом или участвует в сольватации полярного переходного состояния, должны замедляться. Диэлектрическая проницаемость в поверхностном слое мицеллы иодида додецилпиридиния равна примерно 36 по оценке ее из максимума полосы поглощения комплекса переноса заряда между иодидом и пиридином [38].

В гл. 6 было отмечено, что денатурация белка мочевиной и гидрохлоридом гуанидина заключается в энергетически благоприятном взаимодействии этих соединений с амидными и пептидными группами. Энергия этого взаимодействия понижается при замещении атомов водорода в молекулах денатурирующих агентов алкильными группами. Однако мочевины и гидрохлорид гуанидина также способствуют денатурации белков по «гидрофобному» механизму, облегчая контакт неполярных групп с растворителем [31]. Это доказывается их сольбилизирующим действием на углеводороды и на гидрофобные боковые цепи аминокислот, а также дестабилизирующим влиянием мочевины на ионные и неионные мицеллы [32, 33]. Упомянутые два разных механизма действия обеспечивают высокую эффективность этих соединений как денатурирующих агентов на различные типы макромолекул. Их можно различить при исследовании влияния алкилирования на денатурирующую способность мочевины и гуанидинов, так как алкилирование увеличивает эффективность этих соединений при сольбилизации неполярных молекул и оснований нуклеиновых кислот [8, 34, 35].

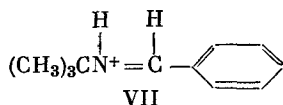
Яркий пример такого типа катализа — ускорение щелочного гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и капроновой кислот бромистым цетилтриметиламмонием (рис. 2) [37]. При постоянном значении рН 10,07 скорости гидролиза обоих субстратов возрастают, но для эфира с более длинной углеводородной цепью, который сильнее взаимодействует с мицеллой детергента, это ускорение значительно больше. При возрастании концентрации катализатора происходит «насыщение» каталитической активности, т. е. скорость реакции не зависит от концентрации катализатора при его избытке. Подобное «насыщение» наблюдается при возрастании концентраций субстрата при постоянной концентрации катализатора. Аналогичные ускорения наблюдались для реакций эфиров с анионами аминокислот в присутствии бромида цетилтриметиламмония. Ускорения, обнаруживаемые в таких системах, в общем невелики; максимальное увеличение скорости кислотно-катализируемого гидролиза метилортобензоата в присутствии додецилсульфата натрия при рН 4,76 равно 85 [37].



Примером ускорения, при котором оба реагента включаются в мицеллу под действием гидрофобных сил, служит ацилирование производного бензиламина V эфиром VI. Резкое увеличение скорости происходит, когда концентрация V превышает его критическую концентрацию мицеллообразования [39].

Высокая плотность положительного заряда на поверхности мицеллы бромида цетилтриметиламмония должна стабилизировать отрицательно заряженные ионы и переходные комплексы, так что в этих случаях наблюдаемое ускорение реакций можно рассматривать как результат возрастания локальной концентрации ионов гидроксила вблизи субстрата, адсорбированного на поверхности мицеллы. Активность иона гидроксила должна быть постоянной для системы в целом, так что понижение коэффициента активности вблизи мицеллы должно приводить к возрастанию концентрации ионов гидроксила в этой области. Ускорение можно описать более непосредственно как следствие понижения коэффициента активности переходного комплекса реакции на поверхности мицеллы по сравнению с коэффициентами активности реагентов в объеме раствора. Это понижение вызывается гидрофобным взаимодействием с неполярными компонентами и электростатическим с заряженными компонентами переходного состояния. Этот вид бифункционального взаимодействия с малой молекулой, различные части которой при посредстве разных механизмов стабилизированы каждая в своем микроокружении на макромолекуле, по-видимому, полностью аналогичен взаимодействию субстратов с активными центрами ферментов.

Подобным же образом можно объяснить изменение *pK* кислот и оснований, адсорбированных на поверхностях мицелл. Так, *pK* соединения VII возрастает от 6,55 в воде до 7,02 на анионной мицелле додецилсульфата натрия, но понижается до 4,96 на катионной мицелле бромида цетилтриметиламмония и приблизительно до 5,0 на незаряженной мицелле неионного детергента [40].



Такие сдвиги отражают влияние простой электростатической стабилизации и дестабилизации катионной кислотной формы этого соединения и ее стабилизацию в относительно слабо сольватирующей среде гидрофобной области мицеллы. Это моделирует аналогичные изменения pK боковых групп или адсорбированных молекул на ферментах и других белках.

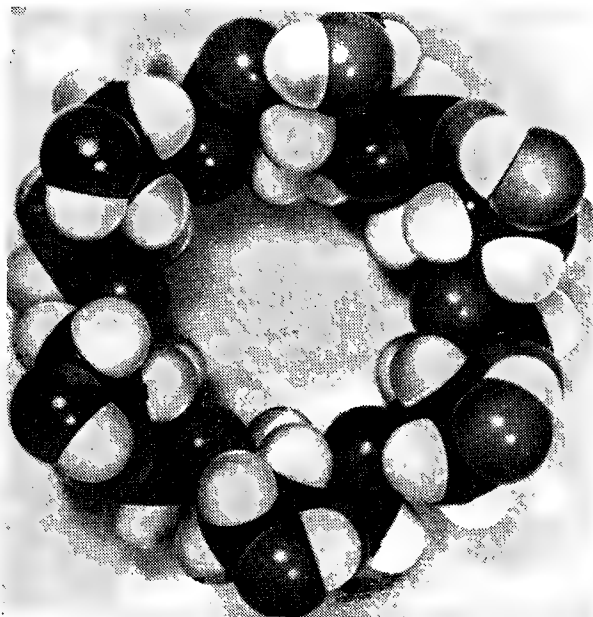
Особенно интересным примером катализа мицеллами, который требует более сложного объяснения и в большей степени аналогичен ферментативному катализу, служит ускорение гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров уксусной и каприловой кислот смешанными мицеллами бромиды цетилтриметиламмония и *N*- α -тетрадеcanoил-*L*-гистидина [41]. Ускорения, наблюдаемые в разбавленном растворе реагентов и катализатора при pH 7,2, приблизительно 30-кратные для ацетата и 1000-кратные для каприлата по сравнению с активностью свободного имидазола. Для проявления каталитической активности необходимо наличие некоторых специфических структурных особенностей смешанных мицелл, так как мицеллы, образованные анионным или катионным компонентами порознь, неактивны. Высокая каталитическая активность, по-видимому, в основном обусловлена сближением субстрата и имидазольной группы катализатора посредством гидрофобных взаимодействий; однако необходимость катионного и анионного компонентов указывает на то, что может осуществляться дополнительная электростатическая стабилизация переходного состояния или что играют роль специфические структурные эффекты.

6. КЛАТРАТЫ, ИЛИ СОЕДИНЕНИЯ ВКЛЮЧЕНИЯ

К этому классу относятся соединения, в которых один компонент «охвачен или защищен барьером или решеткой» из другого компонента. Такие соединения обладают определенным составом, но в общем не являются стехиометрическими и известны главным образом в кристаллическом состоянии. Допустим, что некоторое полярное вещество может существовать в двух кристаллических формах — *A* и *B*, из которых *B* обладает меньшей плотностью и обычно более высокой энергией. Если включающаяся молекула обладает размером и формой, соответствующими вакансиям в более рыхлой структуре *B*, даже небольшого выигрыша энергии за счет слабых вандерваальсовых взаимодействий с молекулами решетки может оказаться достаточным для стабилизации *B* по сравнению с *A*, так что может возникнуть соответствующее соединение включения. Известно много таких примеров, из которых наиболее интересными являются образование в газопроводах твердых клатратов воды с углеводородами значительно выше температуры замерзания воды (что может привести к закупорке трубопровода, если в систему просочится много водяных паров) и стереоспецифическое образование линейных, полностью *транс*-полимеров при полимеризации бутадиена в длинных цилиндрических клатратах мочевины и тиомочевины [42].

В растворе отдельные клатратные частицы, как правило, не существуют, так как их образование сопровождается большими потерями энтропии, однако есть данные о образовании устойчивых соединений включения в растворах циклодекстранов, в которых отдельные молекулы ковалентно связаны между собой в кольцо, так что клатратообразование происходит без больших потерь энтропии (рис. 3). Растворимость бензойной кислоты линейно возрастает с увеличением концентрации циклодекстрана в растворе [43]. Отношение увеличения молярной растворимости к возрастанию молярной концентрации циклодекстрана близко к 1,0, что свидетельствует о росте растворимости в результате образования соединения включения между циклодекстраном и бензойной кислотой состава 1 : 1. Вызываемое циклодекстранами возрастание растворимости длинноцепочечных алифатических карбоновых кислот, содержащих 7...10 атомов углерода, обнаруживает специфичность

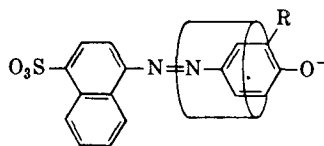
к относительным размерам связывающихся молекул: кислота, содержащая 7 атомов углерода, эффективнее солюбилизуется α -циклодекстраном, образованным шестью остатками глюкозы с диаметром полости приблизительно 6 Å, в то время как кислота, содержащая 11 атомов углерода, эффективнее



Р и с. 3. Молекулярная модель α -циклодекстрана (циклогексампозы) [44].

солюбилизуется β -циклодекстраном, образованным семью остатками глюкозы с диаметром полости 8 Å. Связывание кислоты сопровождается изменением в оптическом вращении циклодекстрана, что можно рассматривать в качестве еще одной модели индуцируемого субстратом изменения конформации.

Связывание с α -циклодекстраном окрашенных веществ, таких, как ион *n*-нитрофенолята и азокрасители, можно изучать спектрофотометрически, так как спектры этих соединений смещаются при связывании. В случае иона *n*-нитрофенолята происходит сдвиг на 15 нм в более длинноволновую область [44]. Константа равновесия комплексообразования с ионом *n*-нитрофенолята равна 2800 л/моль, что соответствует значительной свободной энергии связывания, а именно $-4,7$ ккал/моль ($-19,7 \cdot 10^3$ Дж/моль), причем энтальпия связывания равна в этом случае $-7,2$ ккал/моль ($-30,2 \cdot 10^3$ Дж/моль); *n*-нитрофенол связывается в десять раз слабее. Небольшие молекулы, такие, как *n*-нитрофенол, связываются с циклодекстраном с константой скорости примерно 10^8 л/моль·с (методом температурного скачка), которая близка к константам скоростей процессов, лимитируемых диффузией. Однако красители, замещенные в положении 3' (рис. 4, где R — метил или этил), связываются более чем на семь порядков медленнее, несмотря на то что константа равновесия не меняется по сравнению с незамещенным красителем. Таким образом, заместитель, препятствующий внедрению молекулы красителя,



Р и с. 4. Азокраситель, замещенный в положении 3', входящий в полость α -циклодекстрана [44].

в такой же степени препятствует ее выходу из полости. Эта система служит интересной моделью, демонстрирующей, каким образом связывание фермента с субстратом может происходить значительно медленнее, чем со скоростью диффузии, хотя при этом не происходит образования новых или разрушения старых ковалентных связей.

Некоторые примеры специфичности при ацилировании или фосфорилировании циклодекстранов «субстратами» различной структуры описаны в гл. 1.

Б. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

При объяснении того факта, что неполярные гидрофобные, т. е. почти все органические молекулы в водном растворе стремятся к ассоциации, исследователи довольно четко делятся на тех, кто считает, что это вызвано дисперсионными силами Ван-дер-Ваальса — Лондона, и на тех, кто считает это проявлением «гидрофобных» взаимодействий, возникающих в результате сильного взаимного притяжения молекул воды и сопровождающихся изменениями ее «структуры» вблизи растворенной молекулы. Как правило, никем не предпринимаются серьезные попытки разграничить эти механизмы. Взаимодействие такого типа приписывают обычно вандерваальсовым или гидрофобным взаимодействиям или изменениям в структуре воды, игнорируя другие возможности и часто даже не пытаюсь установить однозначной причинно-следственной связи между наблюдаемым явлением и, например, изменениями в структуре воды. Существующее положение дел указывает на то, что нет определенного критерия, позволяющего различить эти формально допустимые возможности. Действительно, трудно представить себе удовлетворительное описание взаимодействий этого типа, не принимая во внимание как силы взаимного притяжения растворенных молекул, так и изменения в связывании и распределении молекул растворителя.

Некоторые аспекты этих проблем, которые не слишком далеки от своего экспериментального базиса, будут описаны качественно или полуколичественно в данном разделе. Детальное, количественное рассмотрение полезно в том отношении, что оно стимулирует теоретическое осмысливание проблемы, однако автор полагает, что в настоящее время известно слишком мало о природе воды и ее взаимодействиях с растворенными веществами для успешного количественного использования теоретических моделей.

1. ДИСПЕРСИОННЫЕ СИЛЫ ВАН-ДЕР-ВААЛЬСА — ЛОНДОНА

Слабые взаимодействия, существующие между молекулами в газовой фазе, объединяют под общим термином *вандерваальсовы*. Они включают взаимодействия: диполь-диполь, заряд-диполь, заряд-индуцированный диполь, диполь-индуцированный диполь и индуцированный диполь-индуцированный диполь. Распределение электронов в данный момент времени в молекуле, не обладающей постоянным дипольным моментом, не является совершенно однородным, в связи с чем в каждый данный отрезок времени молекула обладает некоторым переменным дипольным моментом. Переменный диполь индуцирует дополнительный диполь в соседней молекуле, который в свою очередь стабилизирует исходный диполь; в следующее мгновение диполи в обеих молекулах меняют свое направление на противоположное (рис. 5). Эти осцилляции диполей приводят к возникновению сил притяжения — лондоновских дисперсионных сил.

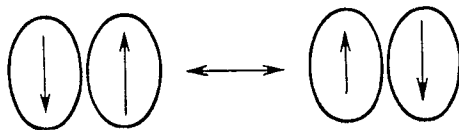
Энергия дисперсионного взаимодействия E между двумя неполярными молекулами определяется уравнением

$$E = -\frac{3\alpha_1\alpha_2(h\nu_1)(h\nu_2)}{2d^6(h\nu_1 + h\nu_2)}, \quad (1)$$

где α — поляризуемость, $h\nu$ — средняя энергия возбуждения, d — расстояние между двумя молекулами, отмеченными индексами 1 и 2. Это уравнение было преобразовано Лондоном к виду (2), где энергии возбуждения заменены потенциалами ионизации I

$$E = -\frac{3\alpha_1\alpha_2}{2d^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}. \quad (2)$$

Предсказанные на основании этого уравнения энергии взаимодействия оказываются меньше, чем найденные экспериментально в газовой фазе. Поэтому



Р и с. 5. Взаимное обращение индуцированных диполей в неполярных молекулах, приводящее к возникновению дисперсионных сил.

были предложены его различные модификации, в которых изменялись колебательные частоты ν индуцированных осциллирующих диполей. Обсуждение этих модификаций и их применений дано Уэббом [45]. Грубую оценку энергии таких взаимодействий можно получить при помощи уравнения

$$E = -238,6 \sqrt{Z} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{d^6}, \quad (3)$$

где Z — число связывающих и несвязывающих электронов на внешних оболочках атомов взаимодействующих молекул или групп, которое для большого числа небольших молекул и групп лежит в пределах 8...16.

Характерной особенностью дисперсионных взаимодействий является пропорциональность их энергии поляризуемости взаимодействующих молекул и ее зависимость от межмолекулярного расстояния d в шестой степени. Однако для молекул, находящихся в тесном контакте, допущение, что расстояние, на котором происходит взаимодействие, велико по сравнению с длиной диполя, не выполняется и вычисление энергии взаимодействия существенно усложняется. В подобных случаях для полиенов [46] и парафинов [47] предполагается, что энергия взаимодействия пропорциональна d в меньшей степени, чем шесть.

Особенно для больших молекул на коротких расстояниях может оказаться предпочтительным использование исходной предпосылки Лондона и рассмотрение взаимодействия монополей, а не диполей. Такой подход используется в серьезной работе Грюнвальда и Прайса, которая вновь пробудила интерес к дисперсионным взаимодействиям в растворе [48]. При переходе от водного к метанольному и этанольному растворам кислотность пикриновой кислоты возрастает по сравнению с трихлоруксусной почти на два порядка. Отрицательный заряд пикрата, по-видимому, в значительной степени делокализован между атомами кислорода нитро-групп в результате резонанса, в то время как заряд трихлорацетата локализован главным образом на двух атомах кислорода карбоксильной группы. Если принять, что недиссоциированные молекулы обеих кислот обладают примерно одинаковой энергией в различных растворителях, то наблюдаемое различие в кислотностях можно объяснить либо большей стабилизацией делокализованного заряда пикрата спиртом, либо большей относительной стабилизацией более локализованного заряда трихлорацетат-иона водой, сильно взаимодействующей с ионами с высокой плотностью заряда. Грюнвальд и Прайс рассмотрели первый случай и показали, что делокализация заряда в пикрате может привести к значительному возрастанию энергии дисперсионного взаимодействия

с растворителем. Они утверждают далее, что дисперсионные взаимодействия с растворителем будут сильнее в спирте, чем в воде, так как атомы растворителя будут эффективнее взаимодействовать с растворенным веществом, если они связаны в единую молекулу ковалентными связями, чем атомы молекул воды, в которой пространство, окружающее растворенную молекулу, в основном представляет собой пустоты между молекулами растворителя. Такая стабилизация пикрата в этаноле должна вносить вклад в наблюдаемое возрастание относительной силы пикриновой кислоты в этом растворителе. Аналогично сравнительно большая устойчивость ионных пар пикрата триметиламмония, чем пикрата аммония, может быть объяснена дисперсионными взаимодействиями с алкильными группами триметиламмония, причем вычисленная энергия этих взаимодействий удовлетворительно объясняет наблюдающееся различие; этот эффект, возможно, является одним из факторов, приводящих к изменению основности аминов при введении алкильных заместителей.

Часто полагают, что особая подвижность π -электронов должна приводить к повышенной поляризуемости и большей энергии взаимодействия ненасыщенных молекул по сравнению с их насыщенными аналогами. Это допущение, вероятно, справедливо, однако оценка величины этого эффекта довольно сложна, а те эксперименты, в которых он проявляется, указывают на то, что он невелик. Действительно, π -электроны обладают повышенной поляризуемостью, но атомы водорода, добавляемые при гидрировании, компенсируют ожидаемое уменьшение поляризуемости, и насыщенный углеводород обладает почти такой же поляризуемостью, что и соответствующая ненасыщенная молекула. Детальные вычисления предсказывают, что должно существовать повышенное дисперсионное взаимодействие параллельных ненасыщенных углеводородных цепей, однако энергия взаимодействия оказывается небольшой и становится еще меньше, если учесть эффекты электронной корреляции (влияние одного электрона на положение другого) [46, 49]. Энергии дисперсионного взаимодействия, вычисленные из теплот сублимации, для сопряженных полиенов с эквивалентными связями очень близки энергиям соответствующих насыщенных углеводородов. Также близки наблюдаемые поляризуемости и теплоты сублимации циклогексана и бензола.

Теплоты смещения ароматических углеводородов с алифатическими указывают на то, что удаление молекулы бензола из окружения других молекул бензола и последующий перенос ее в окружение молекул насыщенного углеводорода энергетически неблагоприятны и требуют затрат энергии до 1 ккал/моль ($4,2 \cdot 10^3$ Дж/моль). Отсюда следует, что средние энергии взаимодействия одинаковых молекул немного больше, чем энергия взаимодействия бензол — углеводород. Эту разницу можно объяснить, если принять, что взаимодействие ароматических молекул между собой несколько усиливается взаимодействием π -электронов [31, 50].

Взаимодействие оснований нуклеиновых кислот в водном растворе (стекинг) может происходить с участием π -электронной системы ароматических оснований, но этот дополнительный стабилизирующий эффект, по-видимому, невелик, так как пурины примерно с такой же эффективностью взаимодействуют в водном растворе со стероидами, преимущественно с α -стороной насыщенных D и C колец, образуя комплексы с константами устойчивости от 10 до 50 л/моль. Таким образом, выигрыш свободной энергии одинаков при взаимодействии пурина с насыщенной и ненасыщенной молекулами, причем энтальпии взаимодействия в обоих случаях отрицательны [51, 52]. Также в незначительной степени наличие π -электронов сказывается во взаимодействии ароматических субстратов с химотрипсином, так как 1) кинетические константы гидролиза N-ацетил-L-фенилаланинамида очень близки к константам гидролиза насыщенного аналога N-ацетил-L-гексагидрофенилаланинамида [53] и 2) связывание гидрофобных ингибиторов с химитрипсином мож-

но описать простой моделью экстракции этих соединений из воды в неполярную среду, и оно ненамного сильнее для ароматических молекул [18].

С практической точки зрения единственной целью изучения дисперсионных взаимодействий является вычисление энергий взаимодействия, вызываемых силами, действующими между растворенными веществами в воде. По мнению автора, в настоящее время невозможно производить надежные расчеты такого рода. Только недавно были проведены подробные расчеты в гораздо более простом случае взаимодействия насыщенных и ненасыщенных молекул известной геометрии и взаимной ориентации в отсутствие воды, и даже эти расчеты для проверки их состоятельности нуждаются в использовании результатов экспериментальных измерений и не могут претендовать на то, чтобы надежно предсказать ожидаемую силу взаимодействия между данными молекулами. В водном растворе проблема становится еще более трудной, так как здесь необходимо оценивать небольшую *разность* между энергиями взаимодействия вода — растворенное вещество, с одной стороны, и вода — вода, растворенное вещество — растворенное вещество — с другой. Дело осложняется еще и тем, что молекулы воды полярны и не имеют сферической формы. Вполне вероятно, что различные по своей геометрии и полярности растворенные вещества по-разному взаимодействуют с молекулами воды. Существующее положение можно проиллюстрировать сопоставлением следующих точек зрения: 1) дисперсионные силы не должны вносить значительный вклад в энергию взаимодействия углеводов в воде, так как поляризуемость на единицу объема очень близка для воды и гексана [54]; 2) как отмечалось выше, дисперсионные силы должны вносить существенный вклад в энергию взаимодействия растворенных веществ между собой или с растворителем, молекулы которого больше по размеру молекул воды [48].

Очевидно, одним из важнейших аспектов этого типа взаимодействий, создающим наиболее серьезные препятствия на пути количественного теоретического рассмотрения, является *геометрия* взаимодействия. Помимо зависимости дисперсионной энергии от размеров и средних расстояний между атомами молекул растворителя и растворенного вещества, необходимо рассмотреть направление поляризуемости, от которого также зависит сила дисперсионного взаимодействия. Поляризуемость обычно определяют из молярной рефракции, являющейся мерой общей поляризуемости молекулы. Однако, как правило, поляризуемость различна по разным направлениям, так что энергия дисперсионного взаимодействия будет зависеть от ориентации и геометрии взаимодействующих молекул. Этот эффект может оказаться особенно важным при сравнении ароматических и алифатических молекул близкой общей поляризуемости, если ароматическая система обладает геометрией, позволяющей ей более эффективно взаимодействовать с другой ароматической системой. Плоские молекулы могут взаимодействовать в различных взаимных ориентациях, в то время как замещенные производные циклогексана в конформации «кресла» будут иметь менее благоприятную энтропию ассоциации из-за небольшого числа взаимных ориентаций, обеспечивающих максимальный контакт взаимодействующих молекул. Введение алкильных заместителей часто уменьшает или вообще устраняет агрегацию красителей, стероидов и других молекул.

Особенно важна взаимная ориентация реагентов при взаимодействиях молекул, обладающих большими постоянными диполями, как, например, основания нуклеиновых кислот. По всей вероятности, диполь-дипольные взаимодействия не являются основной движущей силой взаимодействия этих оснований в водном растворе, так как вода сама по себе служит хорошим растворителем заряженных и высокополярных молекул и сила прямых диполь-дипольных взаимодействий в воде должна быть мала. Действительно, растворимость оснований возрастает, а полинуклеотиды денатурируют при добавлении сравнительно малополярных веществ к воде, хотя при этом дол-

жна уменьшаться сила диполь-дипольных взаимодействий с растворителем и увеличиваться сила диполь-дипольных взаимодействий оснований между собой. Ассоциация нуклеозидов усиливается при возрастании размеров и полярности оснований, но не обнаруживает корреляции ни с дипольным моментом, ни со способностью к образованию водородных связей [55]. Тем не менее диполь-дипольные и другие электростатические взаимодействия в агрегате или спирали будут в большой степени определять общую энергию системы, которая может оказаться как благоприятной, так и неблагоприятной в зависимости от точной взаимной ориентации оснований [56]. Поэтому ни один расчет энергии взаимодействия, например на основании изучения агрегации модельных соединений, не может считаться полным, если он не учитывает этого «геометрического» вклада.

2. ГИДРОФОБНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

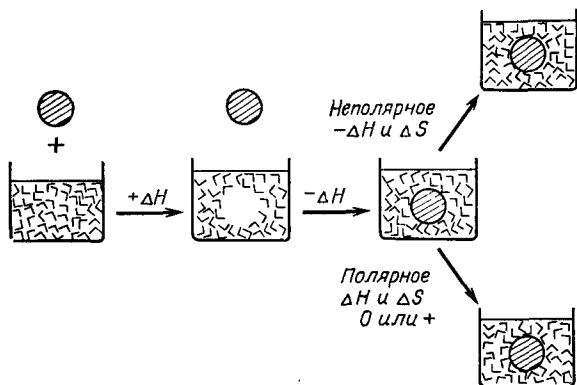
Помимо рассмотрения прямых взаимодействий под влиянием сил Ван-дер-Ваальса — Лондона, существуют два основных подхода для описания растворов гидрофобных молекул в воде и гидрофобных связей. В первом из них подчеркивается необходимость разобщения сильно взаимодействующих молекул воды для внесения слабодействующей молекулы в раствор [13, 54, 57, 58]. Во втором рассмотрении основываются на ограничении свободного движения или возрастании «структурированности» растворителя, которое приводит к уменьшению энтропии при внесении неполярной молекулы в водный раствор [31, 59—61]. Приведенное ниже качественное описание гидрофобной связи основано на этих двух подходах, которые отнюдь не взаимоисключают один другой.

Рассматриваемая модель основана на двух постулатах: 1) особые свойства воды обусловлены в первую очередь сильным взаимным сцеплением молекул воды и 2) изменения энтропии и энтальпии водного раствора могут взаимно компенсироваться, приводя к незначительным изменениям свободной энергии.

а) *Растворы неполярных и слабополярных веществ в воде.* Сильное взаимное притяжение небольших высокополярных молекул воды за счет водородных связей и дипольных взаимодействий проявляется в высокой плотности когезионной энергии и высоком внутреннем давлении жидкой воды, которые намного выше, чем почти для всех остальных обычных жидкостей (исключение составляют жидкая ртуть и перекись водорода). Высокая плотность когезионной энергии проявляется в большом поверхностном натяжении воды. Первый этап растворения неполярного вещества в воде состоит в образовании полости в растворителе (рис. 6), куда будет введена растворяемая молекула. В случае воды свободная энергия образования такой полости будет велика, так как при этом будет происходить разобщение сильно взаимодействующих молекул воды, не компенсируемое слишком слабым взаимодействием неполярного растворяемого вещества с водой. Это внутреннее взаимодействие молекул воды, вероятно, является основной причиной низкой растворимости относительно слабополярных веществ в воде и возникновения «гидрофобной связи». Вычисление изменения энергии при внесении оснований нуклеиновых кислот в воду указывает на то, что основной вклад в энергию процесса вносит свободная энергия образования полости [58].

После образования полости и помещения в нее молекулы растворенного вещества растворитель будет претерпевать дальнейшие изменения, понижающие свободную энергию системы. Водородные связи между молекулами воды при образовании полости рвутся, причем в случае неполярного растворяемого вещества образование компенсирующих водородных связей между ним и водой невозможно. Следовательно, молекулы воды, окружающие растворенное вещество, будут стремиться переориентироваться так, чтобы образо-

вать максимально возможное число водородных связей, особенно при низкой температуре. Эта тенденция к ориентации, возможно, усиливается тем, что существование упорядоченной поверхности вокруг молекулы растворенного вещества обеспечивает максимально возможное дисперсионное взаимодействие с растворителем. В жидкой воде существует множество различных ориентаций, которые может принимать данная молекула, сохраняя при этом энергетически благоприятное взаимодействие с окружающими молекулами. В присутствии неполярного вещества образование водородных связей в одном из



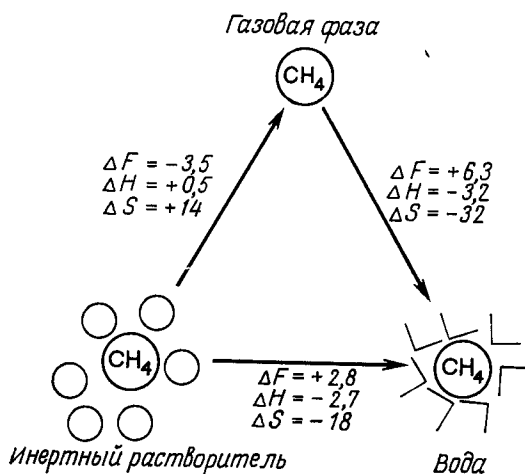
Р и с. 6. Растворение неполярной или полярной молекулы в воде с промежуточным образованием полости. После попадания молекулы растворимого вещества в полость молекулы растворителя могут перестроиться с увеличением степени упорядоченности и числа водородных связей (неполярное растворенное вещество), могут остаться без изменения или могут разупорядочиться с уменьшением числа водородных связей (полярное, деструктурирующее растворенное вещество).

направлений становится невозможным, однако молекула воды может образовать все возможные водородные связи с окружающими молекулами воды с координационным числом равным четырем, если она находится в одной из ограниченного числа подходящих ориентаций по отношению к окружающим молекулам. В результате вокруг неполярной молекулы образуется область, в которой число энергетически благоприятных ориентаций молекул воды ограничено и, следовательно, уменьшена энтропия и увеличена «структурированность» системы. Это понижение энтропии компенсируется энтальпией образования новых водородных связей. Общее число водородных связей в системе при равновесии может быть не меньше, чем в отсутствие растворенного вещества, или даже больше. Таким образом, начальная неблагоприятная энтальпия образования полости компенсируется образованием водородных связей вокруг молекул растворенного вещества, и положительная свободная энергия является следствием отрицательной энтропии растворения. Предельным случаем этого процесса является образование гидратов газов, представляющих собой кристаллические соединения включения инертных газов с водой, где атомы инертных газов окружены молекулами воды в жесткой структуре типа льда.

Теперь рассмотрим молекулы, обладающие значительным общим дипольным моментом или локальными диполями в заместителях, например красители или основания нуклеиновых кислот. В большинстве случаев взаимодействие этих диполей с водой не дает достаточного выигрыша энергии для преодоления неблагоприятной свободной энергии образования полости, так что, как и в случае неполярных веществ, растворимость этих соединений невелика. Однако существуют различия в ориентации молекул воды вокруг растворенного вещества, так как полярные группы влияют на окружающие молекулы воды. В предыдущей главе отмечалось, что сравнительно слабые электрические поля вокруг ионов средних размеров или за пределами первой

гидратной оболочки небольших ионов могут взаимодействовать с молекулами воды, мешая их взаимному сцеплению и понижая степень структурированности раствора. Аналогичным деструктурирующим эффектом могут, по-видимому, обладать слабые поля вблизи диполей полярных молекул. Это должно мешать образованию упорядоченной структуры воды вокруг растворенной молекулы, поэтому неблагоприятная свободная энергия растворения в этом случае связана с неблагоприятной энтальпией процесса.

В обоих этих случаях конечной причиной неблагоприятности свободной энергии растворения является трудность отделения молекул воды друг от друга; в этом находит свое отражение как большая сила водородных связей, так и их большое число в единице объема воды. Неблагоприятными могут оказаться как энтальпия, так и энтропия растворения в зависимости от вторичных взаимодействий с растворителем. В этой книге уже неоднократно отмечалась та легкость, с которой в воде происходят взаимно компенсирующиеся изменения энтальпии и энтропии при незначительных изменениях свободной энергии. Еще ряд примеров этого был обнаружен при



Р и с. 7. Перенос молекулы метана из инертного растворителя в воду непосредственно или через газовую фазу.

измерении активационных и термодинамических параметров процессов, происходящих в воде, содержащей возрастающие количества *трет*-бутанола или других подобных соединений. Растворение органических веществ, солей и переходных комплексов в таких смешанных растворителях сопровождается чрезвычайно большими изменениями энтальпии и энтропии, хотя свободная энергия изменяется незначительно либо остается постоянной при возрастании концентрации *трет*-бутанола до примерно 20 % [62, 63]. Это значит, что потери энтропии, происходящие при структурировании воды, почти полностью компенсируются уменьшением энтальпии в результате увеличения числа водородных связей, которое происходит вследствие упорядочения молекул воды. Необходимо отметить, что существование этих легко происходящих и взаимно компенсирующихся изменений энтропии и энтальпии указывает на то, что процессы, связанные с этими изменениями, могут происходить как *вторичные* и было бы ошибочным приписывать им основную, определяющую роль; основное, что необходимо интерпретировать, — это свободную энергию изучаемых процессов.

Теперь полезно рассмотреть более конкретный пример: перенос молекулы метана из раствора в какой-либо инертной жидкости, типа четыреххлористого углерода или эфира, в воду. Этот процесс можно исследовать непосредственно или через промежуточное образование газообразного метана (рис. 7) *. Метан очень плохо растворим в воде (факт, который часто упускают из вида в пылу дискуссий о детальном механизме этого процесса); сво-

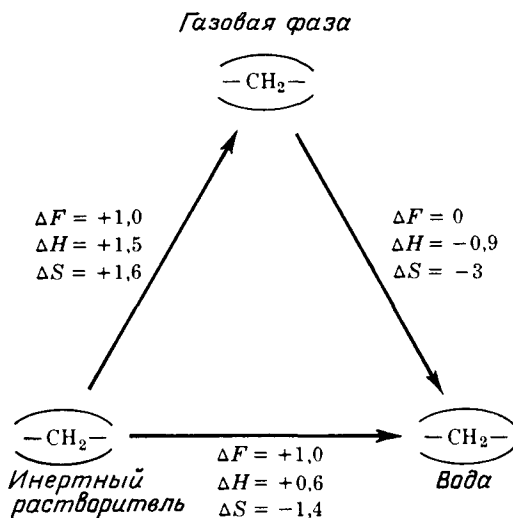
* Величины, приведенные на рис. 7 и 8, основаны на данных, опубликованных в недавней работе Немети и Шераги [61] для ряда углеводородов от метана до бутана. Более ранние данные для широкого ряда соединений приблизительно им соответствуют, однако инкремент в ΔH для переноса метиленовой группы из газовой фазы в воду, вычисленный из данных по спиртам, равен $-1,6$ ккал/моль ($-6,7 \cdot 10^3$ Дж/моль), а инкремент в ΔF для большого ряда соединений равен $0,16$ ккал/моль ($0,67 \cdot 10^3$ Дж/моль) [13].

бодные энергии переноса метана из раствора в инертном растворителе или из газовой фазы в воду составляют 2,8 и 6,3 ккал/моль ($11,7$ и $26,4 \times 10^3$ Дж/моль) соответственно при 25°C . При вычислении этих и всех последующих величин концентрации выражали в мольных долях, чтобы избежать вклада энтропии разбавления в энтропию и свободную энергию процесса.

Энтальпия переноса метана из инертного растворителя в газовую фазу равна $0,5$ ккал/моль ($2,1 \cdot 10^3$ Дж/моль), что соответствует потере энергии вандерваальсовых взаимодействий метана с растворителем; эта цифра имеет ожидаемую величину и знак. Вряд ли энергия вандерваальсового взаимодействия метана с водой может оказаться существенно больше, поэтому отрицательная энтальпия переноса метана из инертного растворителя и из газовой фазы в воду $-2,7$ и $-3,2$ ккал/моль ($-11,3$ и $-13,4 \times 10^3$ Дж/моль) соответственно должна представлять собой изменение энтальпии растворителя в результате усиления взаимного сцепления молекул воды. Степень взаимного сцепления молекул воды в жидком состоянии за счет водородных связей, по-видимому, не является максимально возможной, как во льду; уменьшение числа водородных связей может компенсироваться разупорядочением — увеличением числа возможных ориентаций каждой молекулы в жидкости. Следовательно, степень взаимного сцепления молекул воды может возрастать при внесении неполярного вещества.

Самые большие изменения происходят в энтропии растворения: величина -18 энтр. ед. ($-75,5$ Дж/моль $\cdot$ К) для переноса из инертного растворителя в воду соответствует $5,5$ ккал/моль ($23 \cdot 10^3$ Дж/моль) при обычной температуре. Это уменьшение энтропии перекрывает отрицательные изменения энтальпии $-2,7$ ккал/моль ($-11,3 \cdot 10^3$ Дж/моль) и приводит к общей положительной свободной энергии процесса $+2,8$ ккал/моль ($11,7 \cdot 10^3$ Дж/моль). Энтропия переноса метана из раствора в инертном растворителе в газовую фазу составляет 14 энтр. ед. ($59 \cdot 10^3$ Дж/моль $\cdot$ К), что соответствует увеличению подвижности молекул при переходе из конденсированной в газовую фазу. Большие по абсолютной величине $\Delta S = -32$ энтр. ед. (-134 Дж/моль $\cdot$ К) энтропия переноса из газовой фазы в водный раствор и отрицательная энтропия переноса из инертного растворителя в воду могут быть следствием ограничения движения молекул растворителя, т. е. упорядочения или структурирования растворителя. Эти потери энтропии частично компенсируются увеличением степени взаимного сцепления молекул воды, что проявляется в отрицательной энтальпии переноса метана в водный раствор; разность между ΔH и $T\Delta S$ дает общую положительную свободную энергию переноса из инертного растворителя в воду $2,8$ ккал/моль ($11,7 \cdot 10^3$ Дж/моль).

Поведение гомологов метана можно рассмотреть таким же образом, изучая результаты последовательного введения метиленовых групп в ряду метан — этан — пропан — бутан (рис. 8) *. Наиболее примечательно, что



Р и с. 8. Влияние увеличения числа метиленовых групп на термодинамические параметры переноса углеводорода из инертного растворителя в воду непосредственно или через газовую фазу.

* Примечание на стр. 320.

свободная энергия переноса из инертного растворителя или среды жидкого углеводорода в воду возрастает на $0,7-1,0$ ккал/моль ($2,9-4,2 \cdot 10^3$ Дж/моль) для каждой дополнительной метиленовой группы. Однако при этом энтальпия изменяется на *положительную* величину $+0,6$ ккал/моль ($2,5 \cdot 10^3$ Дж/моль). Эта величина является суммой энтальпии переноса в газовую фазу $+1,5$ ккал/моль ($6,3 \cdot 10^3$ Дж/моль) и энтальпии переноса из газовой фазы в воду $-0,9$ ккал/моль ($-3,8 \cdot 10^3$ Дж/моль). Положительная энтальпия переноса в газовую фазу главным образом обусловлена потерями энергии вандерваальсовых взаимодействий, происходящих в жидкости. Тот факт, что эта величина больше, чем энтальпия переноса в воду, а также наличие положительной энтальпии перехода из растворителя в воду свидетельствуют о том, что при внесении углеводорода в воду не происходит значительного увеличения числа водородных связей в этой среде; фактически либо в воде должно происходить частичное разрушение водородных связей, либо вандерваальсовы взаимодействия углеводорода с водой должны быть слабее, чем с другими углеводородными молекулами (см. выше). Отрицательное изменение энтропии, приблизительно $-1,4$ энтр. ед. ($-5,9$ Дж/моль $\cdot$ К), при переносе метиленовой группы из инертной среды в воду намного меньше, чем для метана, что, вероятно, указывает лишь на небольшое дополнительное структурирование воды при увеличении размеров молекулы углеводорода. Интересно, что свободная энергия растворения в воде «жидкой» метиленовой группы почти полностью определяется свободной энергией переноса в газовую фазу, так что свободная энергия переноса из газовой фазы в воду практически не зависит от размера молекулы углеводорода, в связи с чем растворимость углеводородов в воде при постоянном давлении пара не зависит от размеров их молекул. Влияние размеров молекулы на перенос углеводорода в газовую фазу можно объяснить потерями энергии вандерваальсовых взаимодействий, что проявляется в энтальпии испарения; пренебрежимо малое изменение свободной энергии при переносе из газовой фазы в воду указывает на то, что вандерваальсовы взаимодействия с водой и дополнительное увеличение степени сцепления молекул воды, непосредственно примыкающих к молекуле растворенного вещества, компенсируются увеличением затрат энергии на образование полости для большей молекулы.

Углеводородная цепь такой же длины, как и в молекуле бутана, которую уже можно считать довольно гидрофобной группой, обладает свободной энергией переноса из жидкого бутана в воду $+5,9$ ккал/моль ($24,7 \cdot 10^3$ Дж/моль) и энтропией переноса -22 энтр. ед. ($-92,2$ Дж/моль $\cdot$ К), что не очень сильно отличается от энтропии переноса метана. Противоположные по знаку величины ΔH для метана и для инкремента на каждую метиленовую группу почти полностью взаимно компенсируются в случае бутана, и остается лишь небольшая величина $-0,8$ ккал/моль ($-3,35 \cdot 10^3$ Дж/моль), которая, возможно, отражает небольшое увеличение числа водородных связей вблизи молекулы углеводорода. Аналогичное исчезновение благоприятной энтальпии процесса наблюдается для ароматических молекул; энтальпия переноса молекул бензола из бензола в воду равна $0,6$ ккал/моль ($2,5 \cdot 10^3$ Дж/моль) при 25°C . Термодинамические параметры растворения длинных углеводородных цепей в воде исследовали на спиртах и неионных детергентах, которые обладают достаточной растворимостью, чтобы обеспечить сравнительную легкость экспериментальных измерений. Так же как и алканы с короткой цепью, эти соединения обладают инкрементом растворения $0,6$ ккал/моль ($2,5 \cdot 10^3$ Дж/моль) в ΔH на каждую дополнительную метиленовую группу вплоть до длины цепи в 12 атомов углерода [21, 64]. Однако у соединений с короткой цепью наблюдается небольшое изменение или уменьшение ΔH с ростом длины цепи (до четырех атомов углерода), что указывает на влияние полярной группы на термодинамические параметры растворения углеводородной цепи. Неблагоприятное значение ΔH для соединений с длинной цепью можно объяснить

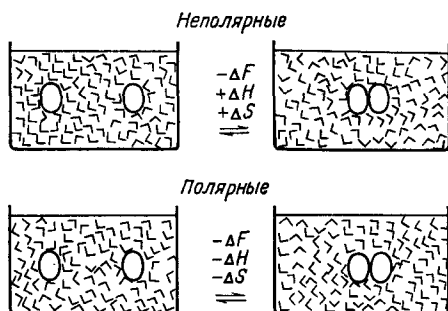
увеличением энергетических затрат на образование полости с ростом длины цепи, так же как в ряду углеводов. Однако точная интерпретация поведения соединений с большей длиной цепи трудна из-за необходимости учета слишком многих факторов, важнейшим из которых является тенденция длинной углеводородной цепи сворачиваться в глобулу, обладающую минимальной поверхностью соприкосновения с растворителем.

б) *Гидрофобная связь*. Трудность переноса сравнительно неполярных молекул в воду создает движущую силу образования «гидрофобной связи». В общем для образования одной большой полости требуются меньшие затраты энергии, чем для образования двух меньших, так что две гидрофобные молекулы в воде должны стремиться одна к другой с тем, чтобы занимать одну полость, подобно тому как коалесцируют капли масла в воде. Свойства гидрофобной связи следуют из описанных выше свойств молекул растворенного вещества в водном растворе. В случае молекул углеводов или веществ, по природе близких к ним, некоторое количество молекул растворителя, структурированного вблизи каждой молекулы растворенного вещества, будет при их ассоциации переходить в окружающий объем водной фазы (рис. 9) и образование гидрофобной связи будет сопровождаться увеличением энтропии и, возможно, увеличением энтальпии, если происходит уменьшение числа водородных связей в системе. Подобные представления о роли полости могут оказаться менее приемлемыми для небольших неполярных групп, таких, как метильная, так как эти группы могут попадать в пустоты или полости, обладающие специфической структурой; однако в большинстве случаев для групп любого размера могут применяться те же принципы.

Характерное увеличение устойчивости многих гидрофобных связей с ростом температуры вплоть до 60 °C связано с положительной энтальпией взаимодействия [31, 65]. Помимо рассмотренных выше примеров, этот тип «классической» гидрофобной связи наблюдается в связывании этана, пропана и бутана рядом белков с ΔH , близким к нулю [66]: в полимеризации белка вируса табачной мозаики, где ΔH составляет 190 ккал/моль ($796 \cdot 10^3$ Дж/моль) и $\Delta S = 682$ энтр. ед. (2860 Дж/моль · К), что соответствует переходу большого числа молекул воды в среду растворителя [67]; в мицеллообразовании с участием неионных детергентов, сопровождающимся величиной $\Delta H \sim 5$ ккал/моль ($21 \cdot 10^3$ Дж/моль) и $\Delta S = 30$ энтр. ед. [23, 68].

С другой стороны, умереннополярные молекулы, вокруг которых вода дополнительно не структурируется, также имеют тенденцию к ассоциации, но в этом случае она происходит либо без изменения, либо с уменьшением энтропии растворителя (рис. 9). Так как растворение таких веществ происходит с увеличением энтальпии, энтропия ассоциации должна быть отрицательна. Согласно этим представлениям, основной причиной ассоциации как неполярных, так и умереннополярных молекул является чрезвычайно сильное взаимное сцепление молекул воды; в последнем случае это выражается непосредственно в благоприятной (отрицательной) энтальпии ассоциации, в то время как в первом проявляется косвенно в виде положительной энтропии ассоциации.

В ряде случаев межмолекулярная ассоциация не может быть просто объяснена электростатическими взаимодействиями, водородной связью или



Р и с. 9. Образование гидрофобной связи между двумя неполярными (вверху) или двумя умеренно полярными (внизу) молекулами в воде.

переносом заряда, хотя она происходит с уменьшением энтальпии и, как правило, с уменьшением энтропии. Эти случаи, вероятно, относятся к типу «неклассической» гидрофобной связи, в образование которой вносят вклад также дисперсионные силы Ван-дер-Ваальса — Лондона. Примерами служат: димеризация катионного красителя тионина $\{\Delta H = -6,8 \text{ ккал/моль } (-28,5 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})\}$ [6], ассоциация других красителей, сопровождающаяся большим уменьшением энтальпии на $25 \text{ ккал/моль } (105 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})$ и уменьшением энтропии на $40\text{--}60$ энтропийных единиц [7], ассоциация пуринов $\{\Delta H = \text{от } -2 \text{ до } -6 \text{ ккал/моль (от } -8,4 \text{ до } -25,2 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})}$ и $\Delta S = \text{от } -6 \text{ до } -16 \text{ энтр. ед. (от } -52,2 \text{ до } -67 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К})\}$ [52] и даже ассоциация пуринов со сравнительно неполярными молекулами стероидов $\{\Delta H = -6 \text{ ккал/моль } (-25,2 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})\}$ [51]. Отрицательная энтальпия стекинга оснований нуклеиновых кислот вносит основной вклад в энтальпию тепловой денатурации ДНК. Необходимо отметить, что причиной отрицательной энтальпии ассоциации скорее могут оказаться изменения в растворителе, чем само по себе взаимодействие ассоциирующих молекул, с использованием которого часто объясняют наблюдаемую отрицательную энтальпию ассоциации. Интересно отметить, что ассоциация красителей, приводящая к метакромазии в воде, не происходит в формамиде и в ряде других растворителей, обладающих как большей, так и меньшей диэлектрической проницаемостью, чем вода [69].

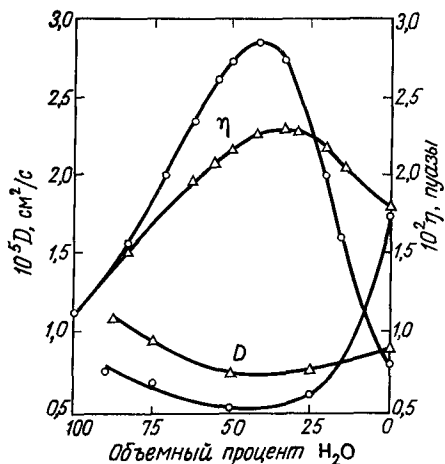
в) «Структура» воды. Уменьшение подвижности молекул воды вблизи неполярной группы, проявляющееся в уменьшении энтропии, часто описывают как образование «айсбергов». Этот удобный, но в принципе неверный термин обозначает просто тот факт, что молекулы воды вблизи молекул растворенного вещества не могут осуществлять вибрацию и вращение в такой же степени, как в основной массе растворителя. Более того, «айсберги» чрезвычайно неустойчивы во времени: никакие льдоподобные частицы структурированной воды не удается обнаружить в экспериментах по диэлектрической релаксации, следовательно, время жизни такой частицы должно быть меньше, чем период диэлектрической релаксации воды, составляющий $10^{-10}\text{--}10^{-11}$ с. На этом основании «структурированная» вода, возможно, лучше описывается как быстро возникающие и исчезающие скопления («мерцающие кластеры») [70]. Наконец, структура воды вблизи углеводорода, скажем метана, несомненно не такая, как в твердом клатрате, образованном метаном и водой. Энтальпия образования этого клатрата из газообразного метана и жидкой воды равна $-12,8 \text{ ккал/моль } (-53,6 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})$, что весьма далеко от величины $-4,6 \text{ ккал/моль } (-19,3 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})$ для энтальпии переноса газообразного метана в жидкую воду при 0°C . Разница в $-8,2 \text{ ккал/моль } (-34,4 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})$ должна отражать увеличение количества структурированной воды при образовании клатрата из водного раствора метана. Отношение этого числа к теплоте плавления воды $1,4 \text{ ккал/моль } (5,9 \cdot 10^3 \text{ Дж/моль})$ равно 5,8, что близко к числу молекул воды, приходящихся на молекулу метана в твердом клатрате [71].

Еще одним понятием, по поводу которого существует много различных мнений, является водородная связь в воде. Большие разногласия вызывает вопрос относительно степени взаимного сцепления молекул воды водородными связями, так как эта степень зависит от метода, используемого для ее оценки [72, 73]. С одной стороны, несомненно, что при обычных температурах в жидком состоянии молекулы воды взаимодействуют между собой очень сильно и отличны от молекул воды в газовой фазе [74]. С другой стороны, столь же несомненно, что в жидкой воде даже при низких температурах степень образования водородных связей не является максимально возможной, как в случае льда или клатратов; ранее было показано, что в жидкой воде может увеличиваться число водородных связей ценой понижения энтропии при небольших изменениях свободной энергии. Состояние молекул воды, не

связанных полностью водородными связями, но ведущих себя далеко не так, как в газовой фазе, до сих пор не вполне выяснено. Их стабилизация может происходить электростатически посредством диполь-дипольных взаимодействий или при возникновении «изогнутых» водородных связей. Это скорее проблема семантическая: водородная связь в значительной степени, если не полностью, представляет собой электростатическое взаимодействие между двумя диполями, один из которых содержит атом водорода, так что трудно провести четкую границу между водородной связью и диполь-дипольным взаимодействием. Можно попытаться провести различие между ковалентными и электростатическими водородными связями, однако и они не вполне четко различимы даже теоретически, и, по-видимому, нет определенных указаний на то, что водородная связь между молекулами воды носит хоть в какой-то степени ковалентный характер.

В связи с этим было бы ошибочно принимать слишком буквально общепринятое утверждение, что с ростом температуры воды происходит разрыв водородных связей и разрушение льдоподобной структуры. Безусловно, нагревание будет увеличивать беспорядок в растворе, поэтому в среднем будут ослабляться водородные связи, так как молекулы будут принимать ориентацию, менее благоприятную для образования максимально прочных водородных связей, и может возрасти число «изогнутых» водородных связей [75]. Если водородные связи в воде носят до некоторой степени ковалентный или кооперативный характер и для их максимальной устойчивости необходимо линейное расположение связей $O-H-O$, нагревание или введение «деструктурирующих» веществ может уменьшить их вклад, но оставить в прежнем состоянии вклад электростатических водородных связей, менее чувствительных к геометрии системы. В настоящее время трудно дать более детальное описание вследствие неполноты наших сведений о природе жидкостей вообще и воды особенно.

Представление о «структурировании» воды или по крайней мере об ограничении подвижности молекул растворителя вблизи неполярной «гидрофобной» молекулы растворенного в воде вещества представляет собой одну из ряда возможных интерпретаций свойств водных растворов, которая убедительно подтверждается различными экспериментальными методами и признается большинством исследователей (но далеко не всеми), занимающихся этой сложной проблемой [76]. Кроме отрицательной энтропии растворения неполярных веществ, существуют еще два сравнительно простых экспериментальных доказательства такого структурирования, основанных на влиянии растворенных веществ на вязкость и диэлектрическую релаксацию воды. Добавление к воде возрастающих количеств диметилформамида приводит к возрастанию вязкости раствора в несколько раз (рис. 10) [77]. При возрастании мольной доли диметилформамида вязкость проходит через максимальное значение и падает до своего значения в чистом диметилформамиде. То же наблюдается в случае N-метилформамида, и в обоих случаях происходит уменьшение коэффициента диффузии, соответствующее возрастанию вязкости. Подобным же образом ведут себя смеси воды с диоксаном, спиртами и другими сравнительно неполярными веществами [78, 79], что указывает на



Р и с. 10. Вязкость и константа диффузии смесей диметилформамида (○), N-метилформамида (△) и воды [77].

общность этого явления в случае молекул, взаимодействующих с молекулами воды слабее, чем молекулы воды взаимодействуют между собой, и на то, что оно не связано с большим дипольным моментом диметилформамида. Это возрастание вязкости означает, что движение молекул в смеси затруднено по сравнению с чистыми компонентами, что указывает на увеличение «структурированности» смеси по сравнению с чистыми компонентами.

Таблица 3
Влияние растворенных веществ
на период диэлектрической релаксации
воды [80]

Растворенное вещество	$\delta\lambda_s (\times 100)$
Диоксан	20
n-Пропанол	35
Аланин	0
NaF	—5
NaCl	—20
NaI	—25
Пропионат натрия	15
$C_2H_5NH_3Cl$	15
$(C_2H_5)_4NCl$	30

Влияние ряда солей и органических растворителей на период диэлектрической релаксации воды показано в табл. 3 [80]. Добавление перечисленных в таблице веществ в концентрациях c вплоть до 1 моль/л вызывает практически пропорциональное изменение периода диэлектрической релаксации воды в соответствии с уравнением

$$\lambda_s = \lambda_{sH_2O} + c\delta\lambda_s, \quad (4)$$

где $\delta\lambda_s$ служит мерой эффективности данного соединения, а знак этого параметра указывает на возрастание или уменьшение периода релаксации с ростом концентрации. Период диэлектрической релаксации раствора является мерой средней скорости ориентации диполей в растворе при наложении внешнего переменного электрического поля. То, что период релаксации увеличивается при добавлении к воде сравнительно неполярных веществ, несмотря на то что средняя сила взаимного сцепления молекул воды должна уменьшаться при введении слабо взаимодействующих молекул, может означать, что происходит ограничение подвижности и упорядочение молекул воды, т. е. увеличение структурированности растворителя. Очевидно, молекула воды вблизи углеводородной поверхности неполярной молекулы не может переориентироваться так же легко и быстро, как и в основной массе растворителя. Этому могут в большей или меньшей степени противодействовать полярные группы в молекуле растворенного вещества. Так, добавление диоксана к воде приводит к периоду релаксации, менее ожидаемого, что можно объяснить локальным нарушением обычной структуры воды атомами кислорода на концах молекулы диоксана [81].

Простые соли, такие, как галогениды щелочных металлов, понижают период диэлектрической релаксации воды (табл. 3). Это одно из наиболее прямых доказательств деструктурирующего влияния таких солей. Уменьшение периода релаксации отражает увеличение подвижности молекул воды в присутствии этих ионов. Однако небольшие высокозарядные ионы образуют плотные гидратные оболочки, в которых молекулы воды настолько жест-

ко ориентированы под действием сильного поля иона, что перестают переориентировываться при наложении внешнего электрического поля. Присутствие этих молекул воды (назовем их «невращательно связанными») должно вызывать уменьшение наблюдаемой диэлектрической проницаемости. Приняв определенную модель раствора, основанную на некоторых допущениях, можно из экспериментальной диэлектрической проницаемости найти число «невращательно связанных» молекул воды с каждым ионом [80, 82]. Вследствие своей «структурирующей» способности такие небольшие ионы вызывают меньшее понижение периода диэлектрической релаксации, чем ионы средних размеров, что видно на примере фторида натрия (табл. 3). Тот факт, что период диэлектрической релаксации проходит через минимум при возрастании концентрации соли и достигает в итоге величины, большей, чем для чистой воды, находится в соответствии с этой общей концепцией: при возрастании концентрации соли происходит уменьшение числа более подвижных молекул воды, находящихся в пустотах «структуры» воды. Далее достигается состояние, когда все молекулы воды находятся вблизи ионов и их подвижность ограничена действием полей ионов [83].

Если размер иона достаточно велик, заряд эффективно экранируется от воды и сила взаимодействия такого иона с молекулами воды будет меньше, чем сила взаимодействия молекул воды между собой. Электрострикция и деструктурирующее влияние, свойственные большинству ионов, в этих случаях исчезают, и такие ионы ведут себя подобно неполярным молекулам. Это проявляется в *возрастании* периода диэлектрической релаксации в присутствии хлорида тетраэтиламмония, т. е. эта соль является «структурирующей» согласно этому и другим критериям. Подобное же возрастание, наблюдаемое для пропионата натрия и хлорида этиламмония, может быть следствием того же эффекта или наличия углеводородного заместителя, примыкающего к заряженным группам ионов.

Очень часто парциальные молярные объемы сравнительно неполярных веществ в водном растворе значительно меньше, чем объемы чистых веществ; широко известным примером служит уменьшение объема при смешивании спирта с водой. Это можно объяснить рыхлостью структуры жидкой воды, из-за чего слабо взаимодействующие молекулы могут легко проникать в пустоты при сравнительно малом увеличении общего объема. Сильные, зависящие от геометрии системы дипольные взаимодействия между молекулами воды приводят к тому, что свободная энергия менее плотной жидкости ниже, чем у состояния, отвечающего максимальной плотности воды, где могла бы достигаться максимальная стабилизация за счет дипольных взаимодействий; молярный объем воды 18,1 мл/моль в полтора раза больше молярного объема 12,5 мл/моль, вычисленного в предположении плотнейшей упаковки молекул воды [84]. Большой молярный объем воды при полном использовании всех возможных водородных связей несомненно проявляется в низкой плотности льда и позволяет приемлемо объяснить, что вода обладает максимальной плотностью при температуре на несколько градусов выше температуры плавления. Увеличение объема при понижении температуры от температуры максимальной плотности до температуры плавления связано с увеличением числа водородных связей и структурированием воды при приближении к состоянию с максимальным числом водородных связей. Не будем вникать в дискуссию по поводу того, можно ли точно описать жидкую воду как двухструктурную систему, состоящую из областей структурированной воды с низкой плотностью и областей с высокой плотностью, где молекулы воды неупорядочены. Отметим лишь, что детали этой дискуссии не влияют на пригодность качественной концепции, заключающейся в том, что возрастание структурированности или числа линейных водородных связей связано с увеличением количества воды, имеющей низкую плотность. Этот процесс происходит в большей степени в присутствии неполярных групп,

которые способствуют структурированию воды и проникают в промежутки между структурированными областями.

Такие изменения объема вносят существенные осложнения в попытки установить количественную связь между взаимодействием вода — растворенное вещество и внутренней когезией воды. В предыдущей главе отмечалось, что последовательность, направление и приблизительная величина воздействий различных солей на водные растворы неполярных веществ коррелируют с плотностью когезионной энергии растворов солей, оцененной из электротетралкиламмония, вызывающие при растворении возрастание объема, увеличивают растворимость гидрофобных веществ. Однако этот критерий неприменим в случае неионных веществ, так как объем при их растворении уменьшается, несмотря на то что они уменьшают внутреннюю когезию воды и увеличивают растворимость гидрофобных веществ.

Очень большие теплоемкости растворов гидрофобных веществ в воде являются еще одним следствием структурирования воды вокруг их молекул; при возрастании температуры эти структурированные области разрушаются и раствор становится более «нормальным» по своим свойствам. Это разрушение оболочки структурированного растворителя вокруг молекулы растворенного вещества объясняет уменьшение растворимости многих гидрофобных веществ с ростом температуры. При этом может произойти разделение фаз при высокой температуре, например в случае алкилзамещенных пиридинов, которые смешиваются с водой при низкой температуре.

Как и при интерпретации влияния солей на водные растворы, основное внимание следует обращать на изменение свободной энергии системы при добавлении неполярных веществ к водным растворам; интерпретация этого явления непосредственно с точки зрения структурной модели может оказаться ошибочной. Так, структурная модель дает приемлемое объяснение сольубилизации гидрофобных соединений под действием спиртов алкилзамещенных аминов и мочевины. Если одно растворенное вещество увеличивает структурированность раствора, можно было бы ожидать, что оно должно облегчать введение молекул другого подобного вещества. С другой стороны, структурирующая способность вещества совершенно необязательна для того, чтобы оно было в состоянии сольубилизовать гидрофобные соединения в воде. Уже отмечалось, что один из возможных механизмов денатурации белков и нуклеиновых кислот под действием мочевины заключается в стабилизации гидрофобных боковых цепей аминокислот и оснований нуклеиновых кислот при увеличении их контакта с растворителем, что проявляется в увеличении растворимости и уменьшении коэффициента активности этих групп в присутствии мочевины [31, 32, 35]. Спирты, ацетон и подобные им вещества разрушают гидрофобные связи и способствуют денатурации аналогичным образом. Однако мочевина, вероятно, не обладает структурирующим действием, по крайней мере в том смысле, как это понимается для неполярных молекул; мочевина очень слабо влияет на большинство свойств воды и либо практически не изменяет «структуру» воды, либо, из данных по поглощению ультразвука, несколько ее разрушает [85]. Данные по энтальпии и теплоемкости растворов веществ с гидрофобными группами, а также исследования спектра ультразвуковой релаксации полиэтиленгликоля в воде и растворах мочевины указывают на то, что энергетически более благоприятное взаимодействие гидрофобных групп с мочевиной, чем с водой, связано с *уменьшением* структурированности воды вокруг гидрофобных групп [85, 86]. Таким образом, разрушение гидрофобных связей под действием мочевины или спирта нельзя объяснить одним и тем же механизмом с точки зрения структуры растворителя, хотя по свободной энергии эффекты соединения этих двух типов одинаковы. Возможно, что мочевина создает более благоприятное окружение для гидрофобных групп, находящихся в пустотах струк-

туры растворителя [87]. Можно было бы ожидать, что потери энтропии из-за ограничения движения одной молекулы мочевины вблизи гидрофобной группы будут меньше, чем при ограничении движения нескольких молекул воды, занимающих то же место. Еще более простое объяснение основано на том факте, что размеры молекулы мочевины значительно превышают размеры молекулы воды, в связи с чем можно ожидать, что потребуются меньшие затраты энергии для разрыва водородных связей между молекулами мочевины и создания полости данного объема в растворе мочевины, чем для разрыва большего числа водородных связей в том же объеме чистой воды, несмотря на то что мочевина обладает большим дипольным моментом, чем вода. Таким образом, водный раствор мочевины должен быть лучшим растворителем для неполярных групп, чем чистая вода, и гидрофобные связи в нем должны разрушаться. Наконец, необходимо учитывать еще одно положение — более сильное вандерваальсово взаимодействие неполярных групп с молекулами мочевины, чем с молекулами воды. Эта гипотеза подтверждается тем, что мочевина уменьшает поверхностное натяжение на границе раздела вода — н-декан, но увеличивает его на границе раздела вода — воздух [88].

Некоторые выводы, сделанные в этой главе, можно кратко суммировать следующим образом. Существуют многочисленные доказательства, что свободная энергия взаимодействия сравнительно неполярных молекул в водном растворе отрицательна, что эти взаимодействия имеют основное значение в процессах ассоциации в водных растворах и что в конечном счете отрицательная свободная энергия этих взаимодействий обусловлена более сильным взаимодействием молекул воды между собой, чем с большинством растворенных веществ. Дисперсионные силы могут давать дополнительный вклад в свободную энергию взаимодействия, но количественная оценка этого вклада в настоящее время для большинства систем затруднительна или даже невозможна. Имеются убедительные доказательства, что вода вблизи неполярного растворенного вещества более «структурирована», чем в основной массе растворителя, и что масштабы этого структурирования уменьшаются при ассоциации или агрегации растворенных веществ. Однако эти структурные изменения не являются необходимым следствием растворения или ассоциации веществ, взаимодействующих с водой слабее, чем взаимодействуют между собой сами молекулы воды, и, возможно, было бы ошибочным приписывать основную роль в процессах ассоциации в водном растворе структурным изменениям в растворителе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karush F., *Advan. Immunol.*, **2**, 1 (1962).
2. Eisen H. N., Siskind G. W., *Biochemistry*, **3**, 996 (1964).
3. Steinhardt J., Fugitt C. H., Harris M., *J. Res. Natl. Bur. Std.*, **26**, 293 (1941); **28**, 201 (1942).
4. Packter A., Donbrow M., *Proc. Chem. Soc.*, **1962**, 220.
5. West W., Carroll B. H., in «The Theory of the Photographic Process» (James T. H., ed.), 3d ed., The MacMillan Company, New York, 1966, p. 233.
6. Rabinowitch E., Epstein L. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 69 (1941).
7. Tanizaki Y., Hoshi T., Ando N., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **38**, 264 (1965).
8. Levine L., Gordon J. A., Jencks W. P., *Biochemistry*, **2**, 168 (1963).
9. Ts'o P. O. P., Melvin I. S., Olson A. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1289 (1963).
10. Chan S. I., Schweizer M. P., Ts'o P. O. P., Helkamp G. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4182 (1964).
11. Fasman G. D., Lindblow C., Grossman L., *Biochemistry*, **3**, 1015 (1964).
12. Bell R. P., Gelles E., Möller E., *Proc. Roy. Soc. (London)*, **198 A**, 308 (1949).
13. Butler J. A. V., *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 229 (1937).
14. Duynstee E. F. J., Grunwald E., *Tetrahedron*, **21**, 2401 (1965).
15. Knowles J. R., Parsons C. A., *Chem. Commun.*, **1967**, 755.
16. Higuchi T., Lachman L., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **44**, 521 (1955).
17. Sahyun M. R. V., *Nature*, **209**, 613 (1966).

18. Hymes A. J., Robinson D. A., Canady W. J., J. Biol. Chem., **240**, 134 (1965).
19. Sandell K. B., Monatsh. Chem., **89**, 36 (1958); Collander R., Acta Chem. Scand., **4**, 1085 (1950).
20. Kiehs K., Hansch C., Moore L., Biochemistry, **5**, 2602 (1966); Hansch C., Kiehs K., Lawrence G. L., J. Am. Chem. Soc., **87**, 5770 (1965); Hansch C., Deutsch E. W., Smith R. N., *ibid.*, p. 2738.
21. Benjamin L., J. Phys. Chem., **68**, 3575 (1964).
22. Robb I. D., Australian J. Chem., **19**, 2281 (1966); McAuliffe C., J. Phys. Chem., **70**, 1270 (1966); Mukerjee P., *ibid.*, **69**, 2821 (1965).
23. Corkill J. M., Goodman J. F., Tate J. R., Trans. Faraday Soc., **60**, 996 (1964).
24. Franks F., Nature, **210**, 87 (1966).
25. Tanford C., J. Am. Chem. Soc., **84**, 4240 (1962).
26. Higuchi T., Connors K., in «Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation» (Reilly C. N. ed.), vol. 4, Interscience Publishers, Inc., New York, 1965, p. 117.
27. Molyneux P., Frank H. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3169, 3175 (1961).
28. DeJong H. G. B., in «Colloid Science» (Kruyt H. R. ed.), vol. 2, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1949, p. 309.
29. Kendrew J. C., Brookhaven Symp. Biol., **15**, 216 (1962); Perutz M. F., J. Mol. Biol., **13**, 646 (1965).
30. Brandts J. F., Hunt L., J. Am. Chem. Soc., **89**, 4826 (1967).
31. Kauzmann W., Advan. Protein Chem., **14**, 1 (1959).
32. Nozaki Y., Tanford C., J. Biol. Chem., **238**, 4074 (1963); Wetlaufer D. B., Malik S. K., Stoller L., Coffin R. L., J. Am. Chem. Soc., **86**, 508 (1964).
33. Schick M. J., J. Phys. Chem., **68**, 3585 (1964); Bruning W., Holtzer A., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4865 (1961); Mukerjee P., Ray A., J. Phys. Chem., **67**, 190 (1963).
34. Gordon J. A., Jencks W. P., Biochemistry, **2**, 47 (1963).
35. Robinson D. R., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2462 (1965).
36. Dujnstee E. F. J., Grunwald E., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4540, 4542 (1959).
37. Behme M. T. A., Fullington J. G., Noel R., Cordes E. H., J. Am. Chem. Soc., **87**, 266 (1965).
38. Mukerjee P., Ray A., J. Phys. Chem., **70**, 2144 (1966).
39. Bruce T. C., Katzhendler J., Fedor L. R., J. Phys. Chem., **71**, 1961 (1967).
40. Behme M. T. A., Cordes E. H., J. Am. Chem. Soc., **87**, 260 (1965).
41. Ochoa—Solano A., Romero G., Gitler C., Science, **156**, 1243 (1967).
42. Brown J. F., Jr., White D. M., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5671 (1960); White D. M., *ibid.*, p. 5678.
43. Schlenk H., Sand D. M., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2312 (1961).
44. Cramer F., Saenger W., Spatz H.-Ch., J. Am. Chem. Soc., **89**, 14 (1967).
45. Уэбб Л., Ингибиторы ферментов и метаболизма, «Мир», М., 1966.
46. Coulson C. A., Davies P. L., Trans. Faraday Soc., **48**, 777 (1957).
47. Salem L., J. Chem. Phys., **37**, 2100 (1962).
48. Grunwald E., Price E., J. Am. Chem. Soc., **86**, 4517 (1964).
49. Sternlicht H., J. Chem. Phys., **40**, 1175 (1964).
50. Watson A. E. P., McLure I. A., Bennett J. E., Benson G. C., J. Phys. Chem., **69**, 2753 (1965).
51. Munck A., Scott J. F., Engel L. L., Biochim. Biophys. Acta, **26**, 397 (1957).
52. Stoesser P. R., Gill S. J., J. Phys. Chem., **71**, 564 (1967); Gill S. J., Downing M., Sheats G. F., Biochemistry, **6**, 272 (1967).
53. Jennings R. R., Niemann C., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4687 (1953).
54. Deno N. C., Berkheimer H. E., J. Org. Chem., **28**, 2143 (1963).
55. Broom A. D., Schweizer M. P., Ts'o P. O. P., J. Am. Chem. Soc., **89**, 3612 (1967).
56. Devoe H., Tinoco I., Jr., J. Mol. Biol., **4**, 500 (1962); Pullman B., Claverie P., Caillet J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **55**, 904 (1966); Nash H. A., Bradley D. F., J. Chem. Phys., **45**, 1380 (1966).
57. Eley D. D., Trans Faraday Soc., **35**, 1281 (1939).
58. Sinanoglu O., Abdunur S., Photochem. Photobiol., **3**, 333 (1964); Fed. Proc., **24**, II, S-12 (1965).
59. Frank H. S., Evans M. W., J. Chem. Phys., **13**, 507 (1945).
60. Powell R. E., Latimer W. M., J. Chem. Phys., **19**, 1139 (1951).
61. Nemethy G., Scheraga H. A., J. Chem. Phys., **36**, 3401 (1962).
62. Arnett E. M., McKelvey D. R., Record Chem. Progr., **26**, 185 (1965).
63. Arnett E. M., in «Physico-Chemical Processes in Mixed Aqueous Solvents» (Franks F., ed.), Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1967, p. 105.
64. Corkill J. M., Goodman J. F., Tate J. R., Trans. Faraday Soc., **63**, 773 (1967).
65. Nemethy G., Scheraga H. A., J. Phys. Chem., **66**, 1773 (1962).
66. Wishnia A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **48**, 2200 (1962).
67. Lauffer M. A., Biochemistry, **5**, 2440 (1966).
68. Schick M. J., J. Phys. Chem., **67**, 1796 (1963).
69. McKay R. B., Hillson P. J., Trans. Faraday Soc., **63**, 777 (1967).
70. Frank H. S., Wen W.-Y., Discussions Faraday Soc., **24**, 133 (1957).

71. *Glew D. N.*, J. Phys. Chem., **66**, 605 (1962).
72. *Hartman K. A., Jr.*, J. Phys. Chem., **70**, 270 (1966).
73. *Conway B. E.*, Ann. Rev. Phys. Chem., **17**, 481 (1966).
74. *Stevenson D. P.*, J. Phys. Chem., **69**, 2145 (1965).
75. *Pople J. A.*, Proc. Roy. Soc. (London), **205 A**, 163 (1951).
76. *Kavanau J. L.*, Water and Solute—Water Interactions, Holden-Day Inc., San Francisco, 1964.
77. *Fratiello A.*, J. Mol. Phys., **7**, 565 (1964).
78. *Geddes J. A.*, J. Am. Chem. Soc., **55**, 4832 (1933).
79. *Franks F., Ives D. J. G.*, Quart. Rev., **20**, 1 (1966).
80. *Haggis G. H., Hasted J. B., Buchanan T. J.*, J. Chem. Phys., **20**, 1452 (1952).
81. *Garg S. K., Smyth C. P.*, J. Chem. Phys., **43**, 2959 (1965).
82. *Glueckauf E.*, Trans. Faraday Soc., **60**, 1637 (1964).
83. *Harris F. E., O'Konski C. T.*, J. Phys. Chem., **61**, 310 (1957).
84. *Desnoyers J. E., Verrall R. E., Conway B. E.*, J. Chem. Phys., **43**, 243 (1965).
85. *Hammes G. C., Schimmel P. R.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 442 (1967); *Hammes G. C., Swann J. C.*, Biochemistry, **6**, 1591 (1967).
86. *Kresheck G. C., Benjamin L.*, J. Phys. Chem., **68**, 2476 (1964).
87. *Abu-Hamdiyyah M.*, J. Phys. Chem., **69**, 2720 (1965).
88. *Corkill J. M., Goodman J. F., Harrold S. P., Tate J. R.*, Trans. Faraday Soc., **63**, 240 (1967).

ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И КОМПЛЕКСЫ С ПЕРЕНОСОМ ЗАРЯДА *

Широкораспространенная неразбериха относительно природы и роли «переноса заряда», «молекулярных комплексов» и «донорно-акцепторных» взаимодействий происходит частично вследствие трудностей, присущих самому предмету, но главным образом представляет собой просто семантическую проблему, возникающую из-за того, что различные школы исследователей, имеющих различные интересы, подходили к этому вопросу с разных сторон и еще не прошло достаточно времени для выработки общепринятых терминов. Так, спектроскописты и органики, по-видимому, имеют в виду совершенно различные вещи, когда говорят о явлении «переноса заряда».

А. МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

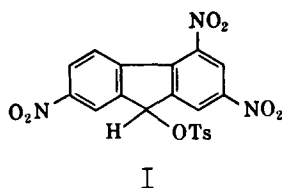
Существует множество широкоизвестных химических явлений, которые могли бы быть более или менее точно описаны посредством приближений, рассмотренных в общих чертах в этой главе, хотя вряд ли найдется хоть один химик, который бы рассматривал их все как проявление единого механизма взаимодействия. К этим явлениям относятся: осаждение ароматических соединений в виде твердых комплексов с нитроароматическими соединениями типа пикриновой кислоты; образование в растворе или в твердом состоянии комплексов, обладающих новой полосой поглощения, отвечающей переносу заряда; образование комплексов между карбонильными соединениями и акцепторными молекулами (типа аддуктов иода с амидами); существование иона I_3^- и ряда комплексов типа иод — пиридин; синие иод-крахмальные комплексы; комплексы иона серебра с олефинами; взаимодействия между флавинами и производными индола в растворе и в твердом состоянии; появление неспаренных электронов и электропроводности в определенных комплексах типа комплекса тетраметилфенилендиамина с хлоранилом; существование координационных связей в окисях аминов, аддуктах трехфтористого бора с четвертичными аминами и в других подобных соединениях и, наконец, даже водородная связь. Все эти явления можно описать как «перенос заряда» или образование «донорно-акцепторных» или «молекулярных» комплексов, и все они в некотором смысле взаимосвязаны.

Вероятно, комплексы с переносом заряда (КПЗ) играют весьма ограниченную роль в катализе и во взаимодействиях биологически важных макромолекул, хотя в ряде случаев было показано существование таких комплексов. Связывание 2,4-динитротолуола с антителами на динитрофенильную группу приводит к уменьшению коэффициента экстинкции в полосе поглощения динитротолуола и появлению новой полосы поглощения динитротолуола при 300 нм, которая указывает на образование КПЗ [2]. КПЗ с участием пиридиновых и флавиновых групп, являющихся активными центрами коферментов, участвующих в биологических окислительно-восстановительных процессах, существуют, как было показано, в довольно специфических условиях и могут принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях

* Для более подробного ознакомления с излагаемыми здесь вопросами см [1].

этих соединений [3]. Какая-то из разновидностей донорно-акцепторных взаимодействий, возможно, является одним из факторов, определяющих спектральные свойства и структуру взаимодействующих нуклеотидов и других сопряженных групп в биологически важных макромолекулах.

Существует доказательство на модельной реакции, что катализ веществом, являющимся донором электронов, включает стабилизацию переходного состояния за счет КПЗ. Скорость сольволиза *n*-толуолсульфоната 2,4,7-тринитрофлуоренола (I) в уксусной кислоте увеличивается в присутствии фенантрена, гексаметилбензола, нафталинов и других ароматических соединений, которые могут служить донорами π -электронов [4]. Это увеличение



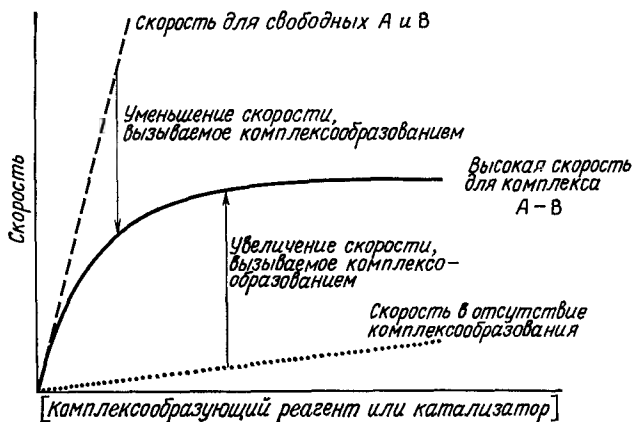
скорости связано с образованием комплекса между субстратом и катализатором, что следует из запределивания скорости реакции с ростом концентрации катализатора. Из зависимости обратная величина ускорения — обратная концентрация катализатора (аналогичная зависимость Лайнуивера — Берка хорошо знакома энзимологам) для катализа 1,5-диметоксинафталином при 85 °С можно найти, что максимальная скорость по сравнению с реакцией в отсутствие катализатора в 1900 раз больше и константа связывания равна 1,0 л/моль. Комплексообразование сопровождается изменением поглощения флуоренильного соединения в видимой области, причем установленная спектрофотометрически константа равновесия комплексообразования с фенантроном 3 л/моль хорошо согласуется с величиной 2,8 л/моль, полученной из кинетических данных. Спектральные изменения обычно состоят в появлении или увеличении поглощения в более длинноволновой области, однако в аналогичных комплексах с тринитрофлуореном наблюдается дискретная полоса поглощения переноса заряда. Более того, каталитическая активность, если за меру ее принять логарифм произведения константы образования комплекса на константу скорости его превращения, пропорциональна электронодонорной способности ряда донорных молекул, оцененной из вычисленных энергий наивысшей заполненной молекулярной орбитали или максимума полосы поглощения переноса заряда в комплексах с тетрацианоэтиленом и хлоранилом.

Константа скорости второго порядка реакции нуклеофильного ароматического замещения между 2,4-динитрохлорбензолом и анилином в этаноле уменьшается с ростом концентрации анилина, что связано с образованием желтого комплекса [5]. Константы устойчивости комплекса равны 0,46 и 0,29 ... 0,34 из кинетических и спектрофотометрических данных соответственно, что является хорошим совпадением. Ни образование комплекса, ни изменение скорости не наблюдаются в менее полярном растворителе — этилацетате. Изменения в константе скорости вызываются, несомненно, образованием комплекса типа КПЗ между реагентами. Однако при интерпретации этого результата возникает традиционная проблема: либо реагируют свободные анилин и динитрохлорбензол (ДНХБ) и скорость *уменьшается* в результате образования нереакционноспособного комплекса при высоких концентрациях реагентов, либо реакция происходит в комплексе и комплексообразование *увеличивает* скорость реакции по сравнению с той, которая наблюдалась бы в отсутствие комплексообразования. Обе эти возможности схематически приведены на рис. 1, а соответствующие им кинетические

уравнения показаны в выражении

$$\text{скорость} = k [\text{анилин}] [\text{ДНХБ}] = k' [\text{комплекс}] = k'K [\text{анилин}] [\text{ДНХБ}]. \quad (1)$$

Кинетически оба случая неразличимы, так как переходные состояния для обоих механизмов имеют одинаковый стехиометрический состав, и произведение $[\text{анилин}] \cdot [\text{ДНХБ}]$ связано с $[\text{комплекс}]$ при помощи константы равновесия $K = [\text{комплекс}] / [\text{анилин}] [\text{ДНХБ}]$, так что $k = k'K$. Выбор между этими механизмами можно сделать, только используя дополнительную информацию. Наиболее полезные сведения дает корреляция между структурой



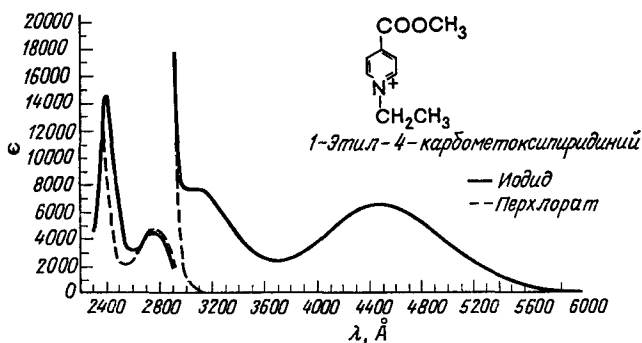
Р и с. 1. Схематическое представление запределения скорости реакции связанного с комплексообразованием и представляющего собой либо уменьшение скорости бимолекулярной реакции (-----), вызываемое образованием неакционноспособного комплекса, либо увеличение скорости по сравнению с наблюдаемой в отсутствие комплексообразования (.....), вызываемое образованием в ходе реакции высокорекционноспособного комплекса (——).

и реакционной способностью. Если известна связь между структурой и реакционной способностью реагентов, не образующих комплекс, и можно вычислить «нормальную» скорость реакции, то, если скорость, наблюдаемая для соединений, образующих комплекс, окажется больше, можно утверждать, что комплексообразование приводит к ускорению реакции, т. е. силы, обеспечивающие устойчивость комплекса, также стабилизируют и переходное состояние. Если скорость реакции в разбавленном растворе между соединениями, образующими комплекс, имеет «нормальную» величину, можно заключить, что реакция происходит между свободными реагентами и комплексообразование приводит к возникновению одного или более непродуктивных комплексов. Для решения этого вопроса в случае реакции анилина с динитрохлорбензолом имеющихся данных недостаточно.

Б. КЛАССИЧЕСКИЕ КПЗ В СПЕКТРОСКОПИИ

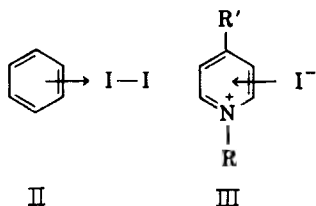
Раствор иода в бензоле имеет красновато-коричневый цвет вместо фиолетового из-за сдвига положения нормальной полосы поглощения иода, вызванного взаимодействием с бензолом. Однако изменения в интенсивности и форме этой полосы невелики, и гораздо более поразительно появление при смешивании иода с бензолом новой полосы поглощения с максимумом при 297 нм, которая связана с образованием комплекса (II). Константу равновесия образования этого комплекса можно определить из зависимости интенсивности этой новой полосы поглощения от концентраций реагентов; она

равна 1,72 л/моль в четыреххлористом углероде [6]. Аналогичное явление наблюдается и для заряженных реагентов замещенных солей пиридиния. Перхлорат 1-этил-4-карбометоксипиридиния в дихлорэтане не поглощает выше 320 нм, однако иодид обладает интенсивной широкой полосой поглощения с максимумом около 440 нм и вторым пиком около 310 нм (рис. 2). Эти



Р и с. 2. Спектры иодида и перхлората 1-этил-4-карбометоксипиридиния в дихлорэтане. Видна полоса поглощения переноса заряда в иодиде [7].

новые пики отсутствуют для отдельных ионов, и характер возрастания их интенсивности с ростом концентрации соли указывает на принадлежность этих пиков комплексу пиридиний-иодид (III) [8].



Появление *новой* полосы поглощения, связанной с образованием комплекса в условиях, когда сохраняется химическая индивидуальность взаимодействующих частиц, на что указывает сохранение их характерных полос поглощения, является доказательством образования классического КПЗ, как его определяют в спектроскопии. Это наиболее точное феноменологическое определение взаимодействия с переносом заряда. Несмотря на то что многие другие явления обладают подобными же свойствами как с теоретической, так и с экспериментальной точек зрения, важно всегда иметь в виду этот основной критерий, и, вероятно, было бы желательно ограничить употребление термина «КПЗ» взаимодействиями рассмотренного типа.

Теория образования КПЗ и их спектральных свойств дана в классической работе Малликена [9]. Рассмотрим молекулу D, являющуюся донором электронов, и акцепторную молекулу A. При сближении этих молекул донор будет стремиться отдать электрон акцептору, так что основное состояние системы можно представить в виде резонансного гибрида форм D, A и $D^+ - A^-$. В дативной структуре $D^+ - A^-$ существует связь между D и A, так что небольшой вклад этой структуры означает, что степень связывания между D и A в комплексе *невелика*. Это можно представить в виде «несвязывающего» резонанса, и основное состояние можно описать уравнением, где a — коэффициент вклада несвязанной формы D, A — намного больше, чем b — коэффициент вклада связанной структуры $D^+ - A^-$.

$$\psi_{ES} = a\psi_0(D, A) + b\psi_1(D^+ - A^-). \quad (2)$$

Необходимо отметить, что при переносе электрона в какой-либо степени от D к A с образованием слабой связи не происходит разрушения электронных пар в компоненте D. В случае если электрон подается от свободной электронной пары в молекуле D, предполагается также, что в ней оба электрона неразличимы, и нельзя считать, что переносится только один из них.

При поглощении света образовавшимся комплексом появляется возможность для одного из этих электронов, локализованного преимущественно на D, перейти в возбужденное состояние на новую орбиталь комплекса, где он будет локализован преимущественно на A. Это состояние описывается уравнением, где коэффициент a^* для вклада формы с переносом

$$\psi^* = -b^*\psi_0(D, A) + a^*\psi_1(D^+ - A^-) \quad (3)$$

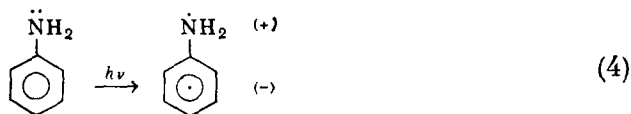
заряда $D^+ - A^-$ в возбужденном состоянии намного больше, чем соответствующий коэффициент b в основном состоянии. (Необходимо сравнивать величины, а не знаки этих коэффициентов, так как распределение электронов зависит от квадрата коэффициентов b .) В комплексе бензола с иодом коэффициенты a и b в основном состоянии равны приблизительно 0,97 и 0,17 соответственно, в то время как b^* и a^* в возбужденном состоянии равны 0,27 и 0,99 соответственно. Возбуждение обычно называют просто процессом переноса заряда, так как распределения заряда в возбужденном и основном состояниях сильно различаются.

Несмотря на то что КПЗ должны по определению обладать полосой поглощения переноса заряда, обратное не верно, и поглощение переноса заряда может происходить даже тогда, когда комплекс не образуется. В умеренно концентрированном растворе существует определенная вероятность, что донорная молекула окажется рядом с акцепторной. Если при этом донор поглотит свет, какой-либо его электрон может перейти в возбужденное состояние на орбиталь переноса заряда в $D^+ - A^-$, даже если в основном состоянии КПЗ не образуется; это явление называется *контактным поглощением переноса заряда* [10]. Константу равновесия образования КПЗ и коэффициент экстинкции комплекса обычно определяют из отрезков, отсекаемых на осях абсцисс и ординат, на графике зависимости обратных величин изменения поглощения, связанного с образованием комплекса, от концентрации одного из реагентов, присутствующего в большом избытке [6]; в случае контактного переноса заряда эта зависимость должна проходить через начало координат.

Важно иметь в виду, что любая измеренная константа равновесия комплексообразования в растворе фактически представляет собой сумму констант равновесия образования всех возможных комплексов стехиометрии 1 : 1 и только в том случае, когда один из этих комплексов гораздо устойчивее, чем все остальные, наблюдаемая константа равновесия будет равна константе устойчивости соответствующего комплекса. Следовательно, наблюдаемая константа равновесия комплексообразования в растворе может быть больше константы устойчивости комплекса, в котором возникает полоса поглощения переноса заряда, если одновременно образуются и другие комплексы, в которых эта полоса отсутствует. Такая ситуация особенно вероятна в случае, когда энергия образования КПЗ мала, что бывает довольно часто. Если только часть образующихся комплексов обладает поглощением переноса заряда, экспериментально найденный коэффициент экстинкции будет занижен, так как он будет усреднен по всем образующимся комплексам. Фактически при очень слабых взаимодействиях почти все наблюдаемое поглощение переноса заряда может быть обусловлено скорее контактными переносом заряда, чем образованием КПЗ. Это проявляется в непостоянстве экспериментально установленного коэффициента экстинкции комплекса в различных условиях в зависимости от доли поглощающих комплексов. Ситуация здесь вполне аналогична непродуктивному связыванию субстратов

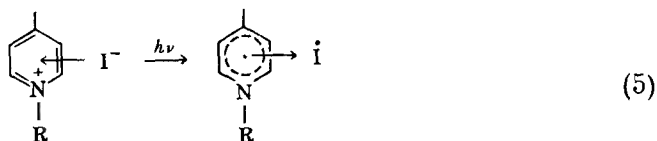
с ферментами, приводящему к аномально низким значениям константы диссоциации фермент-субстратного комплекса и максимальной скорости (гл. 5, разд. Б,2).

Если донорная и акцепторная группы находятся в одной молекуле, перенос заряда может происходить внутримолекулярно. Так, переход $n \rightarrow \pi^*$ в анилине можно рассматривать как возбуждение с переносом заряда, когда распределение электронов в возбужденном состоянии соответствует частичному переносу электрона от атома азота к ароматическому кольцу [схема (4)].

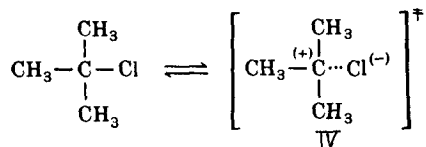


Трудно четко разграничить внутримолекулярное возбуждение с переносом заряда типа, когда электрон переносится от донорной группы D к акцепторной A, и возбуждение, сопровождающееся существенным изменением распределения зарядов в основном и возбужденном состояниях. Использование спектроскопистами термина «перенос заряда» в этом смысле вполне корректно, но это приводит к недоразумениям и путанице вокруг него.

Нет принципиального различия между случаями, когда взаимодействующие молекулы нейтральны или заряжены в основном состоянии, как, например, в комплексах иодида с пиридином. В этих комплексах заряд при возбуждении переходит от иодида к пиридиniu, так что в результате переноса заряда в этом случае скорее происходит уменьшение, чем увеличение степени разделения заряда в комплексе [схема (5)]. Из-за значительных различий



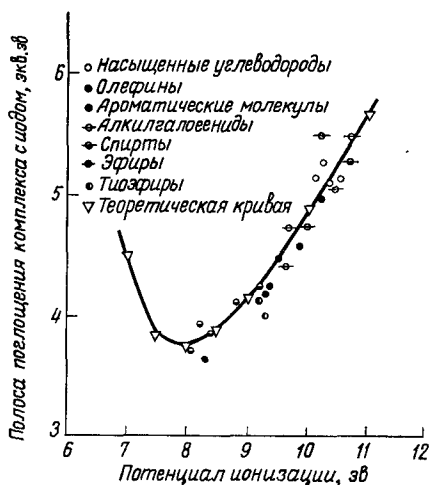
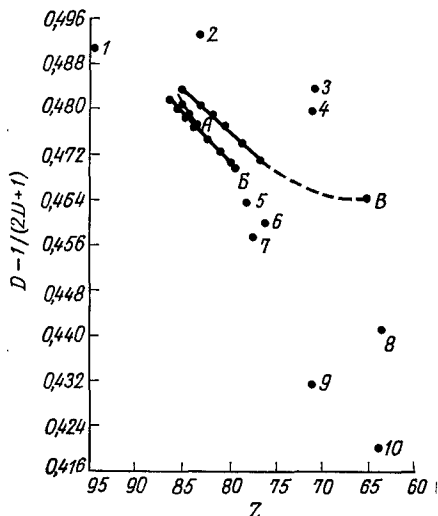
в характере распределения зарядов в основном и возбужденном состояниях энергии этих состояний должны сильно различаться в разных растворителях в зависимости от способности растворителей к сольватации заряда. Следствием этого будет изменение энергии возбуждения и максимума полосы поглощения переноса заряда в разных растворителях. Поэтому положение полосы поглощения переноса заряда может служить чувствительным индикатором сольватирующей способности растворителя. Это обстоятельство было использовано Косовером для создания шкалы параметров Z (характеризующих это свойство растворителей), основанной на энергии возбуждения КПЗ в каждом растворителе [8]. Значения Z в общем хорошо согласуются с величинами параметра Винштейна Y , основанного на скорости сольволиза *трет*-бутилхлорида и являющегося мерой разности энергий неполярного исходного состояния и ионного, подобного карбониевому иону, переходного состояния IV этой реакции в различных растворителях [11]. Почти полное отсутствие корреляции между макроскопической диэлектрической проницаемостью



и способностью растворителей к сольватации заряда при изменении их в широких пределах особенно четко проявляется в большом разбросе точек на

кривой зависимости Z от обычной функции, характеризующей диэлектрические свойства растворителей $(D - 1)/(2D + 1)$ (рис. 3).

Так как классическое поглощение переноса заряда в несложных случаях можно приблизительно описать как результат возбуждения электрона с наивысшей заполненной орбитали донора на самую низкую незаполненную орбиталь акцептора, энергия переноса и положение максимума полосы поглощения должны зависеть от потенциала ионизации донора I_p и сродства



Р и с. 3. Соотношение между функцией Z , характеризующей способность к сольватации заряда, и функцией диэлектрической проницаемости $(D - 1)/(2D + 1)$ для заряда⁺ растворителей.

Р и с. 4. Зависимость энергии полосы поглощения переноса заряда комплексов с иодом от потенциала ионизации донора [12].

Кривые А, В и С соответствуют смесям метанол — вода, этанол — вода и ацетон — вода. Остальные точки: 1 — вода; 2 — формамид; 3 — диметилсульфоксид; 4 — ацетонитрил; 5 — 1-пропанол; 6 — изопропиловый спирт; 7 — 1-бутанол; 8 — пиридин; 9 — *tert*-бутиловый спирт; 10 — дихлорметан [8].

к электрону акцептора E_A . Подобная связь была обнаружена в нескольких сериях комплексов с одним и тем же акцептором и различными донорами. В некоторых сериях наблюдалась линейная зависимость между частотой полосы поглощения переноса заряда $h\nu_{CT}$ и потенциалом ионизации донора, но более подробное исследование показало, что соотношение между ними должно быть более сложным. Энергия полосы переноса заряда для иодидных комплексов связана с потенциалом ионизации донора параболически (рис. 4) по уравнению (6), где C и β приблизительно постоянны в пределах данной серии [12]. Меньше сведений получено относительно влияния срод-

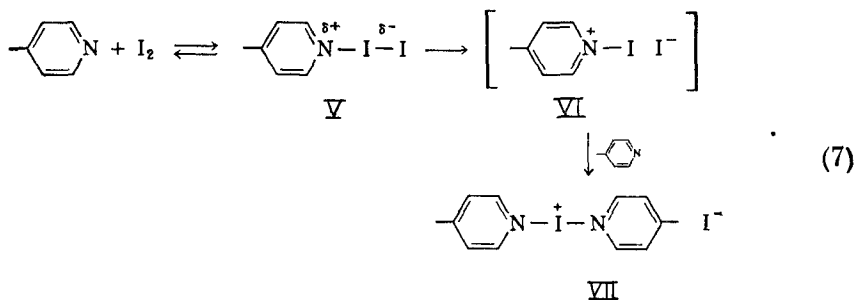
$$h\nu_{CT} = I_p - C + \frac{2\beta^2}{I_p - C} \quad (6)$$

ства к электрону акцептора на положение полосы поглощения, однако имеющиеся данные подтверждают ожидаемую связь между ними. Вычисленные энергии наивысшей заполненной молекулярной орбитали D и самой низкой свободной орбитали A аналогичным образом хорошо коррелируют с энергиями полос поглощения переноса заряда [13].

В. РОДСТВЕННЫЕ ЯВЛЕНИЯ И ДЛИННЫЕ ЭЛЕКТРОНОДЕФИЦИТНЫЕ СВЯЗИ

В классических КПЗ, обычно рассматриваемых спектроскопистами, вклад формы с переносом заряда $D^+ - A^-$, т. е. коэффициент b в уравнении (2), в структуру основного состояния очень мал, так что между A и D в основном состоянии в результате переноса заряда образуется лишь слабая связь. Исходя из этого часто утверждают, что классический перенос заряда не вносит существенного вклада в устойчивость КПЗ, а образующие их молекулы взаимно удерживаются главным образом силами Ван-дер-Ваальса — Лондона (среди которых, по-видимому, особенно существенно взаимодействие квадруполь-индуцированный диполь [14]), в гидроксилсодержащих растворителях — гидрофобными взаимодействиями. Однако Малликен четко показал, что перенос заряда *может быть* по крайней мере таким же важным фактором в стабилизации межмолекулярных взаимодействий, как и дисперсионные силы, и распространение этой концепции за пределы слабых, спектрально регистрируемых комплексов может описывать случаи образования сильной связи [9]. Неизбежные трудности при попытке различить эти родственные явления часто приводят к путанице. В этом разделе будет рассмотрен ряд случаев, когда значительная энергия связи возникает благодаря переносу заряда или «донорно-акцепторным» взаимодействиям, а также случаи, когда классический спектроскопический критерий может оказаться неудовлетворительным. Константы равновесия образования ряда (но не всех) КПЗ возрастают с ростом электронодонорной способности донора и при гамметовской корреляции с замещенными молекулами доноров дают отрицательное значение ρ [15]. Так как эти константы равновесия не зависят в заметной степени от поляризуемости заместителей, можно считать, что подача электрона от донора непосредственно вносит вклад в устойчивость КПЗ.

Поучительным примером комплекса или соединения промежуточного характера служит продукт, образующийся непосредственно в реакции пиридина с иодом [схема (7)]. В случае 4-метилпиридина химическим и рентгеноструктурным анализом было показано, что этот продукт имеет структуру V.



Длина связи $\text{I} - \text{I}$ равна $2,83 \text{ \AA}$, что на $0,17 \text{ \AA}$ больше, чем в молекуле I_2 ; длина связи $\text{N} - \text{I}$ равна $2,31 \text{ \AA}$, что значительно превышает длину обычной ковалентной связи $\text{N} - \text{I}$, равную $2,03 \text{ \AA}$, но намного меньше, чем сумма ван-дер-ваальсовых радиусов N и I , равная $3,65 \text{ \AA}$. Таким образом, это соединение можно представить как комплекс 4-метилпиридина с иодом, в котором связь $\text{I} - \text{I}$ несколько ослаблена и вытянута и образована длинная слабая связь $\text{N} - \text{I}$. Оно удовлетворяет спектроскопическому критерию КПЗ, так как обладает новой по сравнению с исходными веществами полосой поглощения при 235 нм . Однако комплекс обладает значительной устойчивостью: константа равновесия его образования равна 290 л/моль в гептане [17], а константа устойчивости комплекса иода с диэтиламино в диоксане равна

146 000 л/моль [18]. Устойчивость комплексов возрастает с увеличением электронодонорной способности донора: устойчивость пиридиновых комплексов пропорциональна основности пиридина и следует гамметовской корреляции с величиной $\rho = -2,34$ [19]. Нерастворимое в воде соединение V следует отличать от растворимого в воде ионного комплекса VII, который образуется при продолжительном взаимодействии пиридинов с иодом. Образование этой соли может происходить через промежуточный продукт VI, который отличается от V тем, что в нем образуется сильная связь N — I, а связь I — I разрывается.

Ион триодида (I — I — I)⁻, который в общем считается устойчивым соединением, представляет собой комплекс такого же типа, как и комплексы иода с пиридином, причем роль пиридина играет анион иодида. Иногда считают, что взаимодействия с переносом заряда с элементами второго периода или более тяжелыми элементами в качестве акцепторов заключаются в подаче электрона на свободные *d*-орбитали акцептора. Однако в данном случае существенное взаимодействие может происходить без этого, а устойчивость триодида можно объяснить при помощи простой модели молекулярных орбиталей [20], подобной той, которая была описана для водородной связи. Рассмотрим три атома иода, каждый из которых предоставляет для образования связи по одной *p*-орбитали. Из этих трех атомных орбиталей можно построить три молекулярные орбитали, показанные на схеме (8), на которых можно разместить четыре электрона триодид-иона:

$$\begin{array}{c}
 \text{I} \quad \text{I} \quad \text{I} \\
 p_1 \quad p_2 \quad p_3
 \end{array}$$

$$\begin{aligned}
 \psi_3 &= \frac{N'}{\sqrt{2}} (p_1 + p_3) + \lambda' p_2 && \text{антисвязывающая} - \text{незанята} \\
 \psi_2 &= \frac{1}{\sqrt{2}} (p_1 - p_3) && \text{несвязывающая} \quad \therefore \quad \begin{array}{c} \cdot\cdot \\ \text{I} \end{array} \quad \begin{array}{c} \cdot\cdot \\ \text{I} \end{array} \\
 \psi_1 &= \frac{N}{\sqrt{2}} (p_1 + p_3) - N\lambda p_2 && \text{связывающая} \quad \therefore \quad \text{I} \div \text{I} \div \text{I}
 \end{aligned} \quad (8)$$

Два первых электрона будут находиться на самой нижней связывающей орбитали, охватывающей все три атома иода и создающей относительно длинную слабую электронодефицитную связь, включающую два электрона и три атома. Следующая электронная пара заполнит промежуточную несвязывающую орбиталь, где электроны локализуются на концевых атомах иода, а наивысшая антисвязывающая орбиталь остается незанятой. Локализация несвязывающих электронов на крайних атомах объясняет повышенную прочность таких комплексов, как (Cl — I — Cl)⁻, в которых крайние атомы имеют повышенную электроотрицательность.

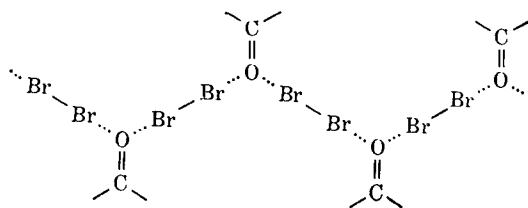
Тот же тип взаимодействия позволяет объяснить природу связи в больших полигалогенидных ионах, таких, как I₅⁻, а также объясняет характерную геометрию этих соединений. Хорошо известные иодкрахмальные комплексы, имеющие характерный синий цвет, образуются из длинных, отрицательно заряженных полигалогенидных цепей, которые находятся в центре кольца или спирали молекулы крахмала, и, вероятно, в них реализуются такие же или подобного типа взаимодействия [21].

Этот важный общий метод описания соединений, в которых атомы проявляют большую, чем обычно, валентность, применим также к соединениям типа PCl₅. В ранних попытках описать подобные молекулы повышенная валентность объяснялась посредством *d*-орбиталей фосфора. Молекула PCl₅ имеет структуру тригональной бипирамиды, в которой две связи P — Cl, направленные к вершинам, длиннее трех остальных связей, расположенных в горизонтальной плоскости. Структуру подобных молекул можно удовлетворительно объяснить без привлечения *d*-орбиталей. При этом считается, что три нормальные P — Cl-связи расходятся от атома фосфора, образуя основа-

ние пирамиды, а два атома хлора в вершинах образуют с атомом фосфора длинную электронодефицитную связь, подобную связи в I_3 . Таким же образом можно описать структуры ряда других соединений, включая PF_5 , SF_6 , ICl_4 и галогениды инертных газов XeF_2 и XeF_4 [20, 22].

Очевидно, нет существенной разницы между таким описанием КПЗ и описанием ковалентной природы водородной связи в гл. 6, разд. В, методом молекулярных орбиталей, за исключением симметрии рассматриваемых орбиталей. В обоих случаях образуются длинные, довольно слабые, электронодефицитные связи из двух электронов между тремя атомами системы на связывающей орбитали и второй парой электронов на несвязывающей орбитали, охватывающей концевые атомы. Далее в обоих случаях устойчивость системы, по-видимому, определяется главным образом взаимодействиями иного типа, например электростатическим взаимодействием в водородной связи, дисперсионными или гидрофобными взаимодействиями в КПЗ, однако в обоих случаях существует вероятность, что ковалентная связь может оказаться сильной и даже может вносить основной вклад в устойчивость системы, если молекулы донора и акцептора имеют благоприятное строение и геометрию.

Особенно интересные примеры донорно-акцепторных комплексов были обнаружены при исследовании взаимодействия карбонильных и ацильных групп с льюисовскими кислотами и другими акцепторами. Взаимодействия амидов и других карбонильных соединений с протоном, льюисовскими кислотами типа трифторида бора и хлорида алюминия и «переносящими заряд» акцепторами типа иода или брома в общем происходят путем подачи неподеленной пары карбонильного кислорода к акцептору. Это приводит к удлинению связи $>C=O$ и укорочению связи с расположенным рядом электронодонорным атомом азота в амиде, а также к увеличению чувствительности карбонильной группы к нуклеофильной атаке. Удлинение связи $>C=O$ проявляется в понижении на 43 см^{-1} частоты валентных колебаний карбонильной группы N, N-диметилацетамида в его комплексе с иодом [23]. Подобные комплексы, как правило, неустойчивы и имеют константы устойчивости порядка нескольких единиц; так, константы равновесия образования комплексов N, N-диметилбензамида с иодом в четыреххлористом углероде составляют приблизительно 4 л/моль [24]. Эти комплексы проявляют ожидаемое увеличение устойчивости при введении электронодонорных заместителей; величина ρ для образования комплексов иода с замещенными N, N-диметилбензамидами равна $-0,7$ [24], а комплексы с амидами более устойчивы, чем с простыми карбонильными соединениями типа ацетона, в которых подача электронов от рядом расположенных атомов к карбонильной группе происходит в гораздо меньшей степени. Структура одного из представителей этой группы — комплекса брома с ацетоном в твердом состоянии — была установлена рентгенографически, и было обнаружено, что она представляет собой зигзагообразную сетку VIII, в которой каждый карбонильный кислород связан с двумя молекулами брома [25]:

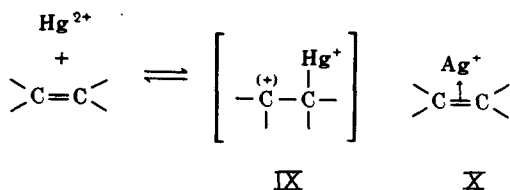


VIII

Образование связи в этих соединениях можно рассматривать как результат подачи электронной пары атома кислорода на незанятую орбиталь акцептора — s -орбиталь протона, вакантную связывающую орбиталь льюисовской

кислоты, вакантную d -орбиталь брома или антисвязывающую орбиталь ароматической молекулы — либо как результат образования новой гибридной орбитали, для построения которой не требуется d -орбитали, как это было описано выше для I_3^- . Взаимодействия обоих типов, вероятно, существенны в зависимости от природы реагирующих веществ.

Комплексы металлов с ненасыщенными молекулами бывают двух типов. В первом из них металл образует новую σ -связь с одним из атомов углерода олефина. Такой тип взаимодействия был обнаружен в комплексах с ионом ртути и в большинстве продуктов присоединения протона (IX). Наиболее известным примером комплексов другого типа являются комплексы иона серебра с олефинами, в которых серебро не присоединяется к какому-либо из атомов углерода, а скорее взаимодействует с π -электронами двойной связи в виде донорно-акцепторного комплекса X. Комплексы этого типа, вероятно,



в значительной степени стабилизируются в результате обратной подачи электронов с d -орбиталей иона металла на антисвязывающую π -орбиталь олефина или ароматической молекулы.

Г. НЕСПАРЕННЫЕ ЭЛЕКТРОНЫ И РАДИКАЛЫ

Вопрос о роли неспаренных электронов и радикалоподобных состояний в донорно-акцепторных комплексах и КПЗ составляет одну из наименее

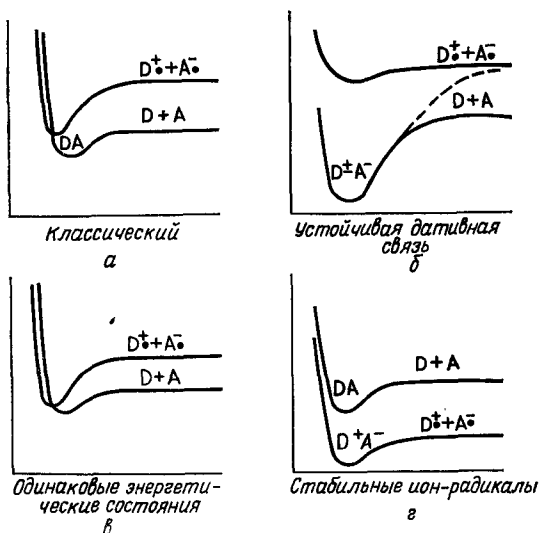


Рис. 5. Кривые потенциальной энергии для основного и возбужденного состояний донорной и акцепторной молекул и их ион-радикалов.

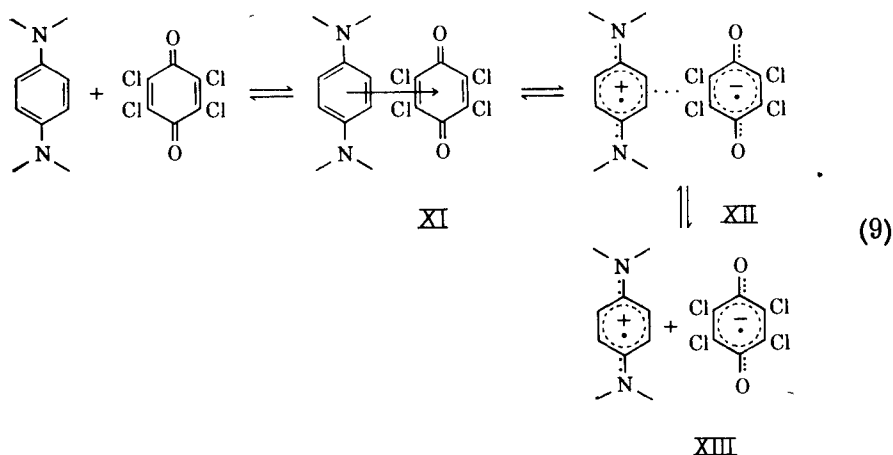
ясных сторон рассматриваемой проблемы [26]. Как отмечалось выше, никогда не считают, что электроны при образовании таких комплексов *должны* быть разделены или неспарены. Однако при увеличении силы взаимодействия в ряду соединений могут происходить совершенно другие явления в зависимости от структуры донора и акцептора (рис. 5). Если коэффициент b в уравнении (2), отвечающий вкладу формы с переносом заряда $D^+ - A^-$ в основное состояние, увеличивается и структуры донора и акцептора таковы, что скорее образуется устойчивое соединение, чем ион-радикальная пара, основное состояние системы будет отвечать обычной ковалентной «дативной» связи и возбужденное состояние может быть труднодостижимым,

так что не будет наблюдаться полосы поглощения переноса заряда (рис. 5, б). Так происходит, например, в комплексах триалкиламинов с трехфтористым

бором R_3NBF_3 и в окисях аминов $\text{>N}^+ - \text{O}^-$.

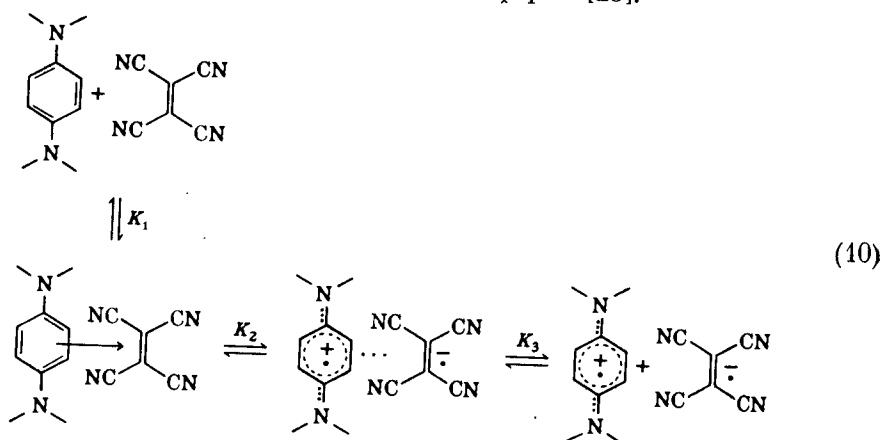
Если у реагентов, образующих стабильные ион-радикалы, потенциал ионизации донора уменьшается, а сродство к электрону акцептора увеличивается, могут образоваться как комплекс, так и отдельные ионы (рис. 5, *в* и *г*). Одна из возможностей состоит в том, что КПЗ в состояниях D , A и $D^+ - A^-$ имеет близкие равновесные энергии, так что комплекс может существовать при обычной температуре в виде равновесной смеси D , A и $D^+ - A^-$ (рис. 5, *в*). Вероятно, наиболее устойчивым состоянием комплекса $D^+ - A^-$ будет такое состояние, в котором электроны будут спарены, т. е. синглетное состояние, и образование такого комплекса не будет приводить к разобшению электронных пар, если только значительная часть комплексов не будет существовать в триплетном состоянии. Более вероятным источником неспаренных электронов в таких системах являются отдельные ион-радикалы $D^+ \cdot$ и $A^- \cdot$, которые могут существовать в растворе как таковые при диссоциации комплекса $D^+ - A^-$ (рис. 5, *г*). Разница между комплексами $D^+ - A^-$ этого типа и обычной дативной или координационной связью заключается не в степени разделения заряда в основном состоянии, которая велика в обоих случаях, а в устойчивости связи между донором и акцептором, т. е. в относительной устойчивости соединения и отдельных ион-радикалов.

Комплексы фенилендиамина и его метилированных производных с хлоранилом (тетрахлорбензохиноном) или тетрацианэтиленом иллюстрируют несколько таких возможных типов взаимодействия [схемы (9) и (10)]. В неполярных растворителях типа циклогексана эти молекулы образуют нормальные КПЗ с характерной полосой поглощения переноса заряда [XI, схема (9)]. При увеличении сольватирующей способности растворителя в ряду смесей циклогексан — ацетонитрил — вода или при добавлении этанола к хлороформу полоса переноса заряда исчезает и в видимой области появляются характерные полосы поглощения ион-радикалов, возникающих при потере электрона донором и присоединении электрона к акцептору. Эти полосы в итоге становятся преобладающими, что сопровождается появлением сигнала ЭПР, указывающего на присутствие неспаренных электронов [27, 28].



Этот новый продукт может существовать в виде комплекса, ионной пары XII или может распасться на отдельные ион-радикалы XIII, которые в случае системы фенилендиамин — хлоранил представляют собой хорошо известный синий катион-радикал Вюрстера и анион-радикал хлоранила. В случае системы тетраметилфенилендиамин — тетрацианэтилен константы равновесия отдельных стадий реакции (9) были оценены по данным ультрафиолетовой спектроскопии в различных растворителях; величина K_2 мала

в эфире, равна 0,17 в тетрагидрофуране и велика в ацетонитриле, где происходит почти полный переход в заряженные формы [28].



Равновесия в системах этого типа схематически показаны уравнением

$$D + A \rightleftharpoons D, A \rightleftharpoons D^+ - A^- \rightleftharpoons D^+ + A^-.$$

(11)

Хотя эта схема приемлема и обоснована, она до сих пор еще не исследована экспериментально достаточно тщательно. Даже различные экспериментальные характеристики, в которых проявляются эти равновесия, — видимые и ультрафиолетовые спектры реагентов и продуктов, концентрация неспаренных электронов на разделенных ион-радикалах и свойства ионной пары $D^+ - A^-$, находящейся в равновесии с ион-радикалами, — не были исследованы ни для одной системы в каком-либо одном растворителе. Совершенно ясно лишь то, что комплексы D, A и $D^+ - A^-$ различимы и обладают в общем разными спектральными свойствами и что обе эти частицы могут одновременно существовать в растворе. Таким образом, XII *нельзя* считать просто частицей D, A (XI), в которой коэффициент b для формы с переносом заряда $D^+ - A^-$ велик. Важно всегда помнить о различии между резонансными структурами и фактическими электронными состояниями комплексов: комплекс D, A является единой частицей или состоянием, которое можно рассматривать как построенное из вкладов резонансных структур D, A и $D^+ - A^-$, причем вклад первой из них имеет большее значение. Наоборот, $D^+ - A^-$ представляет собой другую единую частицу, в которой резонансная структура $D^+ - A^-$ вносит больший вклад. Последний комплекс подробно экспериментально не исследован, но некоторые его свойства можно предсказать на основании свойств других димеризованных радикалов в растворе [29]. При сближении двух сравнительно устойчивых радикалов будет возникать тенденция к образованию (слабой) связи между ними, т. е. спаривание электронов и переход системы в синглетное состояние; это значит, что комплекс не должен обладать интенсивным сигналом ЭПР. Может быть обнаружена новая полоса поглощения, возникающая в результате взаимодействия обоих компонентов таким же образом, как возникает полоса поглощения переноса заряда в комплексе D, A .

Правомерен вопрос, почему комплексы D, A и $D^+ - A^-$ могут существовать в тепловом равновесии, т. е. обладать близкими энергиями, и в то же время при возбуждении электрона может происходить перенос заряда с D, A на $D^+ - A^-$, означающий, что эти два состояния имеют разные энергии. Эта кажущаяся аномалия является следствием принципа Франка — Кондона, состоящего в том, что возбуждение электрона происходит намного быстрее, чем переориентировка атомов комплекса и окружающих молекул раствори-

теля к их наиболее устойчивой конфигурации (Косовер [1]). Таким образом, происходит возбуждение на энергетический уровень, на котором геометрия комплекса и расположение окружающих молекул растворителя такие же, как и в исходном состоянии, а энергия его выше, чем равновесная энергия сольватированного комплекса $D^+ - A^-$.

Существование твердых КПЗ, обладающих небольшой электропроводностью и небольшим числом неспаренных электронов, послужило основой многих спекуляций о возможной роли твердых КПЗ, проводимости и электрических свойств твердых тел в биологических системах. В ряде случаев эти комплексы обладают инфракрасными и электронными спектрами, характерными для ионов D^+ и A^- , и можно считать, что их структура аналогична структуре комплекса $D^+ - A^-$ в растворе. Так, комплексы фенилендиамин — хлоранил в твердом состоянии дают характерные видимые и инфракрасные спектры голубого катиона Вюрстера и аниона семихинона, что несомненно указывает на перенос электрона с образованием структуры типа XII [30]. Механизм электропроводности и образования неспаренных электронов в этих твердых телах все еще далеко не ясен. Несомненно, в некоторых случаях большую роль играют примеси и дефекты решетки. Вероятно, эти электроны возникают из неспаренных электронов триплетных состояний, которые в небольшом количестве находятся в тепловом равновесии с более устойчивым синглетным состоянием [31, 32]. Взаимодействие между электронами ионов D^+ и A^- в твердом состоянии, по-видимому, приводит к слабому связыванию и образованию синглетного состояния. Четкие сведения о том, что твердые комплексы типа D, A содержат значительные количества возбужденных ионных состояний при обычной температуре или что они обладают неспаренными электронами или проводимостью, существенными в биологических системах, по-видимому, отсутствуют.

Д. ДОНОРНО-АКЦЕПТОРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ПЕРЕНОС ЗАРЯДА В БИОХИМИИ; ФЛАВИНОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Для большинства примеров «взаимодействий с переносом заряда», описанных для биологических систем, не было показано, что они представляют собой классические КПЗ и в действительности почти наверное не являются комплексами этого типа. Основным критерием при идентификации КПЗ является присутствие новой полосы поглощения переноса заряда, и этот критерий был удовлетворен лишь в немногих случаях. Кроме этого, желательно чтобы было продемонстрировано: 1) что максимум этой полосы поглощения смещается при изменении полярности растворителя в ожидаемом направлении и 2) что положение этой полосы смещается в ожидаемом направлении при изменении энергии наивысшей заполненной молекулярной орбитали донорной молекулы и самой низкой незаполненной орбитали акцепторной молекулы в предполагаемом комплексе. Если взаимодействие с переносом заряда вносит вклад в устойчивость комплекса в основном состоянии, следует также показать, что его устойчивость изменяется в ожидаемом направлении при изменении энергий этих орбиталей.

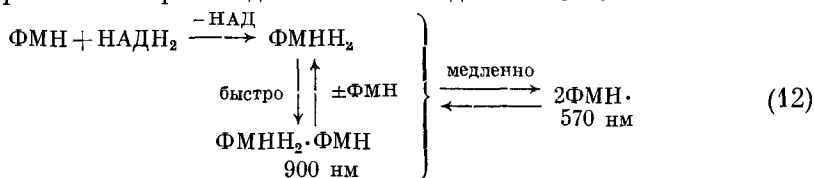
С другой стороны, существуют указания на то, что донорно-акцепторные взаимодействия некоторого типа могут играть важную роль в системах, не обладающих классической полосой поглощения переноса заряда. Настоящий сторонник существования такого типа взаимодействий всегда может обратиться к водородной связи, как к примеру важного в биологии донорно-акцепторного взаимодействия. Существует ряд примеров комплексообразования в водном растворе, когда, по-видимому, наблюдается приблизительная корреляция между устойчивостью комплекса и энергиями орбиталей донора и акцептора, причем устойчивость комплекса нельзя просто объяснить гид-

рофобными или дисперсионными силами. Эти примеры включают: денатурацию миоглобина под действием ряда ароматических соединений, вероятно, в результате взаимодействия с протестической геминной группой [33]; образование комплексов между рибофлавином и нуклеозидами [34]; образование комплексов между ароматическими молекулами и метилциннаматом, что приводит к сильному ингибированию гидролиза этого эфира [35]. В общем необходимо получить гораздо большее число данных по системам такого типа, прежде чем появится возможность оценить величину движущих сил, которые могут возникать в результате донорно-акцепторных взаимодействий в водном растворе.

Наиболее широко изученными примерами взаимодействий этого типа между биохимически важными молекулами являются флавиновые комплексы. Комплексы, образованные фенолами или оксинафталинами и *протонированными* флавинами в кислых растворах, являются классическими КПЗ с полосой поглощения переноса заряда, положение которой коррелирует с потенциалом ионизации донорной молекулы [36]. Константы равновесия образования этих комплексов довольно значительны и лежат в интервале 1...160 л/моль. Однако константы равновесия никак не связаны с потенциалом ионизации донора или положением полосы переноса заряда. Следовательно, устойчивость этих комплексов обусловлена не взаимодействием с переносом заряда, а силами иного типа.

Большой интерес для биохимии представляют комплексы между восстановленным флавиномононуклеотидом (ФМНН₂) и пиридиновым кольцом ряда аналогов никотинамидадениндинуклеотида. Эти комплексы обладают константами образования в пределах 1...10 л/моль и новой полосой поглощения, положение которой коррелирует со сродством к электрону акцепторной пиридиновой молекулы [37]. В комплексах флавинов с индолсодержащими соединениями существует «хвост» увеличенного поглощения в длинноволновой области, который может представлять собой полосу переноса заряда, однако в комплексах с пуринами и другими ароматическими молекулами происходит лишь небольшой сдвиг исходной полосы поглощения без появления новой полосы. Эти последние комплексы, по всей вероятности, не являются классическими КПЗ [37—39].

Флавиновые комплексы могут принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях этих соединений [3]. Флавиномононуклеотид (ФМН) неферментативно восстанавливается восстановленным никотинамидадениндинуклеотидом (НАДН₂) с образованием за средние времена смеси полностью восстановленного флавина и частично восстановленных флавиновых семихиноновых радикалов [40]. То, что восстановление является скорее двухэлектронным процессом, сопровождающимся превращением в радикалы, чем одноэлектронным процессом, в котором радикалы образуются в качестве первичных продуктов, доказывается тем, что появление радикалов, измеряемое методом ЭПР, происходит медленнее, чем появление полностью восстановленного флавина, и имеет период задержки {схема (12)} [41]. Прямое исследование частично восстановленной флавиновой системы методом температурного скачка показало, что ФМН и ФМНН₂ реагируют со скоростью, близкой к скорости диффузионных процессов с образованием димера, обладающего максимумом поглощения при 900 нм, который обычно считают КПЗ, а также что превращение в две молекулы семихинона с максимумом поглощения при 570 нм происходит намного медленнее [42]:



Растворимость модельного пептида — этилового эфира ацетилтетраглицина — увеличивается в присутствии солей, содержащих ароматические группы таких, как бензоаты или бензиламмоний, в то время как соответствующие соли, не содержащие ароматических групп, такие, как триметилацетат и хлорид циклогексиламмония, обладают гораздо меньшим эффектом или даже вызывают уменьшение растворимости пептида [43]. Аналогично фенол в концентрации 0,5 моль/л вызывает приблизительно двукратное возрастание растворимости пептида, в то время как диоксан и тетрагидрофуран почти не влияют на его растворимость. Это указывает на существование взаимодействия между ароматическими системами и пептидной группой, которое не является простым «гидрофобным». Вероятно, это именно то взаимодействие, которое ответственно за хорошо известное денатурирующее и солубилизирующее действие фенола на белки и которое делает возможным отделение белков от нуклеиновых кислот при экстракции фенолом [44]. Природа этого взаимодействия не известна, однако необходимость наличия ароматичности указывает, что оно может представлять собой «донорно-акцепторное» взаимодействие некоторого типа или «молекулярный комплекс», либо дисперсионное взаимодействие Ван-дер-Ваальса — Лондона с участием π -электронной системы ароматического соединения и либо n -, либо π -орбитали амида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эндрюс Л. Д., Куффер Р. М., Молекулярные комплексы в органической химии, «Мир», М., 1967; Briegleb G., Elektronen—Donator Acceptor-Komplexe, Springer-Verlag, Berlin, 1964; Kosower E. M., Progr. Phys. Org. Chem., 3, 81 (1965).
2. Eisen H. N., Siskind G. W., Biochemistry, 3, 996 (1964).
3. Kosower E. M., «The Enzymes», vol. 3, 1960, p. 171; Progr. Phys. Org. Chem., 3, 81, (1965); Gibson Q. H., Massey V., Atherton N. M., Biochem. J., 85, 369 (1962).
4. Colter A. K., Wang S. S., J. Am. Chem. Soc., 85, 114 (1963); Colter A. K., Wang S. S., Megerle G. H., Ossip P. S., ibid., 86, 3106 (1964); Colter A. K., Hui S. H., J. Org. Chem., 33, 1935 (1968); Colter A. K., personal communication.
5. Ross S. D., Kuntz I., J. Am. Chem. Soc., 76, 3000 (1954).
6. Benesi H. A., Hildebrand J. H., J. Am. Chem. Soc., 71, 2703 (1949).
7. Косовер Э., Молекулярная биохимия, «Мир», М., 1964.
8. Kosower E. M., J. Am. Chem. Soc., 80, 3253 (1958).
9. Mulliken R. S., J. Am. Chem. Soc., 74, 811 (1952).
10. Orgel L. E., Mulliken R. S., J. Am. Chem. Soc., 79, 4839 (1957).
11. Smith S. G., Fainberg A. H., Winstein S., J. Am. Chem. Soc., 83, 618 (1961); Fainberg A. H., Winstein S., ibid., 78, 2770 (1956) and references therein.
12. Hastings S. H., Franklin J. L., Schiller J. C., Matsen F. A., J. Am. Chem. Soc., 75, 2900 (1953).
13. Dewar M. J. S., Lepley A. R., J. Am. Chem. Soc., 83, 4560 (1961); Dewarr M. J. S., Rogers H., ibid., 84, 395 (1962); Lepley A. R., ibid. p. 3577.
14. Hanna M. W., J. Am. Chem. Soc., 90, 285 (1968).
15. Эндрюс Л. Д., Куффер Р. М., Молекулярные комплексы в органической химии, «Мир», М., 1967; Charton M., J. Org. Chem., 31, 2991, 2996 (1966).
16. Hassel O., Rømming C., Tuft T., Acta Chem. Scand., 15, 967 (1961).
17. Reid C., Mulliken R. S., J. Am. Chem. Soc., 76, 3869 (1954).
18. Kobinata S., Nagakura S., J. Am. Chem. Soc., 88, 3905 (1966).
19. Aloisi G., Cauzzo G., Mazzucato U., Trans. Faraday Soc., 63, 1858 (1967).
20. Rundle R. E., Record Chem. Progr., 23, 195 (1962); Surv. Progr. Chem., 1, 81 (1963); Wiebenga E. H., Havinga E. E., Boswijk K. H., Advan. Inorg. Chem. Radiochem., 3, 133 (1961).
21. Rundle R. E., J. Am. Chem. Soc., 69, 1769 (1947); Stein R. S., Rundle R. E., J. Chem. Phys., 16, 195 (1948); Thoma J. A., French D., J. Am. Chem. Soc., 82, 4144 (1960).
22. Rundle R. E., J. Am. Chem. Soc., 85, 112 (1963).
23. Schmulbach C. D., Drago R. S., J. Am. Chem. Soc., 82, 4484 (1960).
24. Carlson R. L., Drago R. S., J. Am. Chem. Soc., 85, 505 (1963).
25. Hassel O., Strømme K. O., Acta Chem. Scand., 13, 275 (1959).
26. Kosower E. M., Progr. Phys. Org. Chem., 3, 113 (1965).
27. Foster R., Thomson T. J., Trans. Faraday Soc., 58, 860 (1962); Isenberg I., Baird S. L., Jr., J. Am. Chem. Soc., 84, 3803 (1962).
28. Liptay W., Briegleb G., Schindler K., Z. Elektrochem., 66, 331 (1962).

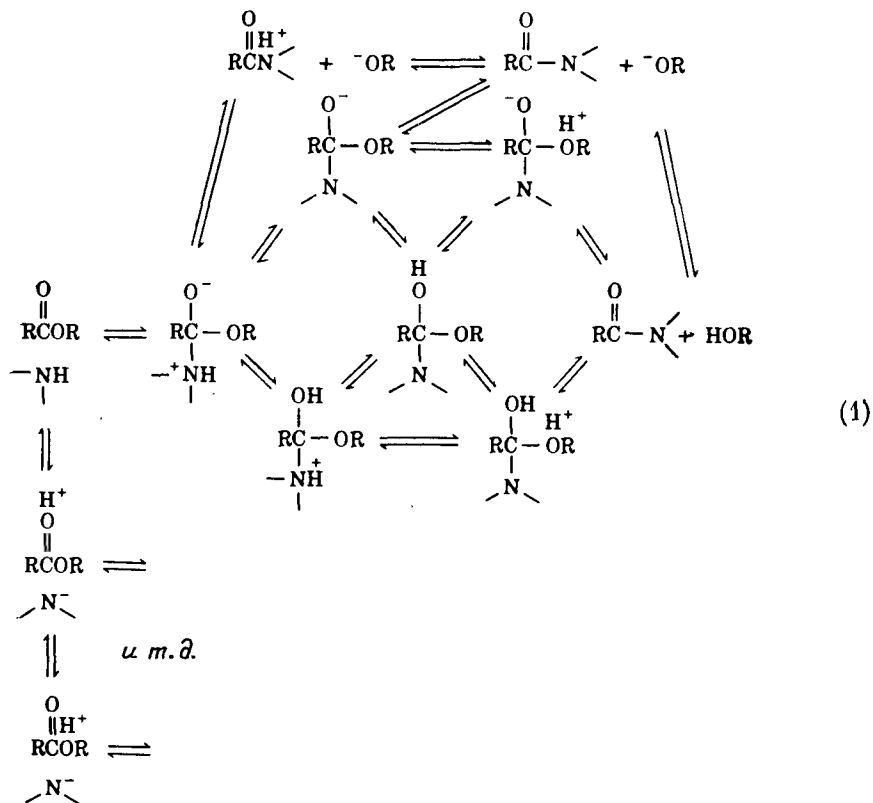
29. *Kosower E. M., Ikegami Y.*, J. Am. Chem. Soc., 89, 461 (1967); *Itoh M., Kosower E. M.*, ibid., p. 3655; *Itoh M., Nagakura S.*, ibid., p. 3959; *Boyd R. H., Phillips W. D.*, J. Chem. Phys., 43, 2927 (1965).
30. *Matsunaga Y.*, J. Chem. Phys., 41, 1609 (1964); *Anex B. G., Hill E. B., Jr.*, J. Am. Chem. Soc., 88, 3648 (1966).
31. *Chesnut D. B., Phillips W. D.*, J. Chem. Phys., 35, 1002 (1961).
32. *Nordio P. L., Soos Z. G., McConnell H. M.*, Ann. Rev. Phys. Chem., 17, 237 (1966).
33. *Cann J. R.*, Biochemistry, 6, 3427, 3435 (1967).
34. *Tsibris J. C. M., McCormik D. B., Wright L. D.*, Biochemistry, 4, 507 (1965).
35. *Mollica J. A., Jr., Connors K. A.*, J. Am. Chem. Soc., 89, 308 (1967).
36. *Fleischman D. E., Tollin G.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, 38 (1965).
37. *Massey V., Palmer G.*, J. Biol. Chem., 237, 2347 (1962); *Sakurai T., Hosoya H.*, Biochim. Biophys. Acta, 112, 459 (1966).
38. *Harbury H. A., LaNoue K. F., Loach P. A., Amick R. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 45, 1708 (1959); *Harbury H. A., Foley K. A.*, ibid., 44, 662 (1958).
39. *Wilson J. E.*, Biochemistry, 5, 1351 (1966).
40. *Suelter C. H., Metzler D. E.*, Biochim. Biophys. Acta, 44, 23 (1960).
41. *Fox J. L., Tollin G.*, Biochemistry, 5, 3865 (1966).
42. *Swinhart J. H.*, J. Am. Chem. Soc., 87, 904 (1965).
43. *Robinson D. R., Jencks W. P.*, J. Am. Chem. Soc., 87, 2470 (1965).
44. *Bawden F. C., Pirie N. W.*, Biochem. J., 34, 1258, 1278 (1940); *Grassmann W., Defner G.*, Z. Physiol. Chem., 293, 89 (1953); *Shepherd G. R., Hopkins P. A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 103 (1963).

РЕАКЦИИ КАРБОНИЛЬНОЙ И АЦИЛЬНОЙ ГРУПП*

А. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ МЕХАНИЗМА

Химические и биохимические реакции с участием карбонильной группы или ее производных чрезвычайно широко распространены. Ввиду особой важности этих соединений, а также пригодности методов, которые используют для их изучения при исследовании иных реакций, в этой главе обобщены в свете представлений, изложенных в предыдущих главах, некоторые аспекты механизмов реакций карбонильной и ацильной групп, а также катализа этих реакций в неферментативных системах. Несмотря на то что исследователи еще далеки от полного понимания этих процессов, особенно на ацильном уровне окисления, в настоящее время уже сделаны некоторые общие выводы относительно их механизма, и перспектива объединения механизмов большинства этих реакций в общую схему становится реальной в течение ближайших лет.

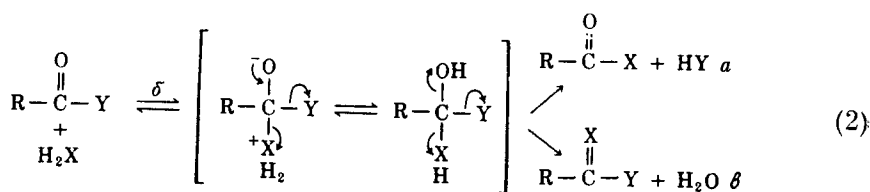
Несколько возможных путей аминоллиза сложного эфира — «простой» реакции переноса ацильной группы — проиллюстрировано схемой (1), где



* Для более полного ознакомления с излагаемыми здесь вопросами см. [1].

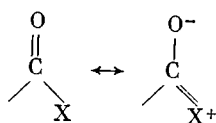
приведены стадии образования и распада тетраэдрического промежуточного продукта присоединения и связанные с ними стадии переноса протона. На самом деле эта схема *упрощена*, так как в ней рассмотрена только одна из нескольких кинетически эквивалентных возможных ионных форм исходных веществ, а также исключены молекулы кислотных и основных катализаторов, участвующих в стадиях переноса протона. Более того, возможно, что некоторые или даже все стадии являются согласованными и здесь не существует промежуточных продуктов, обладающих значительным временем жизни. Ясно, что эта как будто простая реакция в действительности сложна и полная детализация ее механизма — нелегкая задача.

В механизме реакций этого типа две проблемы являются основными: тетраэдрический промежуточный продукт и перенос протона. За присоединением карбонильной группы к молекуле H_2X может последовать либо отщепление группы Y {что происходит в реакциях переноса ацильной группы [схема (2, а)]}, либо отщепление атакующей группы X с образованием исходных веществ [схема (2, б)], либо протонирование и отщепление атома кисло-

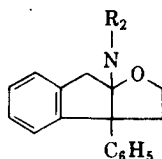


рода, как при образовании азотистых производных карбонильных соединений [схема (2, в)], либо, наконец, обмен меченого атома кислорода в карбонильной группе ацильного соединения на атом кислорода из воды [схема (2, в), $X=O$]. Все эти реакции могут в принципе протекать без образования устойчивого промежуточного тетраэдрического продукта присоединения. Поэтому в первую очередь при исследовании этого механизма встают проблемы определения возможности образования подобного промежуточного продукта в ходе реакции, и если он образуется, то какая стадия является скоростью определяющей: его образование или распад?

Хорошо известны тетраэдрические продукты присоединения альдегидов и кетонов. Если резонансная стабилизация альдегида почти отсутствует или если карбонильная группа присоединена к сильным электроно-акцепторным заместителям, вещество существует в воде главным образом в виде гидрата. Ацетальдегид существует в воде приблизительно наполовину в виде гидрата и наполовину в виде свободного карбонильного соединения, в то время как формальдегид и хлораль почти полностью гидратированы в воде [2]. Ацильные соединения образуют тетраэдрические продукты присоединения гораздо труднее из-за резонансной стабилизации карбонильной группы группой X (I). Поэтому образование термодинамически устойчивого продукта



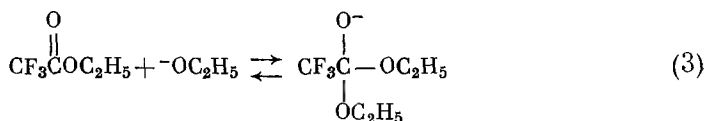
I



II

присоединения наблюдается только в тех случаях, когда оно облегчено сильными электроноакцепторными заместителями или циклическими структурами. Этоксильный ион присоединяется к этиловому эфиру трифторуксусной кислоты с образованием устойчивого продукта присоединения в дибутиловом

эфире в условиях, когда невозможен распад на продукты гидролиза {уравнение (3)} [3]; также устойчивыми соединениями являются некоторые циклические тетраэдрические аддукты, такие, как (II), даже если $R = H$ [4].



Таким образом, нет сомнений в существовании тетраэдрических продуктов присоединения, а проблемы, возникающие в реакциях переноса ацильной группы, заключаются в установлении факта их образования в условиях реакции, в проверке того, что реакция действительно проходит через них, и в определении, достаточно ли времени их жизни, чтобы они проявлялись кинетически и заслуживали название «промежуточный продукт». В настоящее время кинетический метод, по-видимому, является наилучшим для решения этих вопросов.

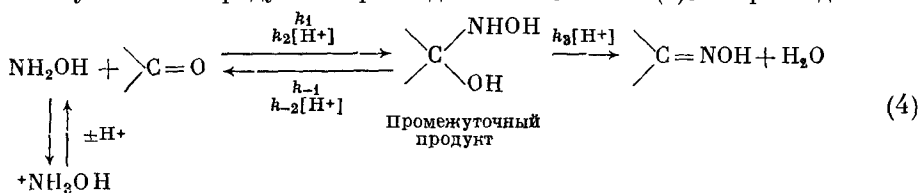
Второй основной проблемой в этих реакциях является перенос протона: где, когда и каким образом он происходит? Эта проблема, особенно интересная в связи с механизмами катализа, была рассмотрена в гл. 3, а в данной главе будет описано применение этих методов к специфическим реакциям.

В первом разделе будут рассмотрены примеры кинетических последствий возникновения в ходе реакции тетраэдрического продукта присоединения, а во втором — свойства ряда реакций карбонильной и ацильной групп. Реакции расположены в соответствии со строением переходного состояния около реагирующего атома углерода. Так, гидролиз амидов, аминолиз сложных эфиров и гидролиз имидатов происходят через переходные состояния, в которых два атома кислорода и один атом азота взаимодействуют с центральным ацильным атомом углерода, поэтому для сравнения механизмов этих реакций полезно выяснить механизм какой-либо одной из них.

1. ТЕТРАЭДРИЧЕСКИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И СКОРОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ СТАДИЯ

Прежде чем приступить к рассмотрению механизма реакций на ацильном уровне окисления и катализа в этих реакциях, следует обсудить более простые реакции карбонильной группы, в которых можно непосредственно наблюдать тетраэдрический промежуточный продукт присоединения. Лимитирующая стадия в таких реакциях может быть надежно определена, и механизм катализа часто можно установить методами, описанными в общих чертах в гл. 3. Методы исследования и некоторые общие представления относительно механизма и катализа, развитые для этих сравнительно простых реакций, можно впоследствии применить к более сложным реакциям переноса ацильной группы.

Примером использования кинетического метода для демонстрации возникновения тетраэдрического промежуточного продукта присоединения в ходе реакции, позволяющей наблюдать его непосредственно, служит взаимодействие гидроксиламина с альдегидами [5]. При нейтральных значениях pH гидроксилламины быстро присоединяются к карбонильному соединению и скорость определяющей стадией образования оксима является отщепление воды от промежуточного продукта присоединения [схема (4)]. Присоединение



можно наблюдать непосредственно при высоких концентрациях гидроксил-амина по исчезновению максимума поглощения карбонильной группы в ультрафиолетовой или инфракрасной области. Измеряя уменьшение поглощения карбонильной группы при различных концентрациях гидроксил-амина, можно вычислить константу равновесия образования промежуточного продукта. Вблизи нейтрального значения pH скорость реакции пропорциональна активности ионов водорода, что свидетельствует о кислотном катализе на стадии дегидратации. В этих условиях скорость реакции зависит от равновесной концентрации продукта присоединения и от активности ионов водорода и выражается кинетическим уравнением (5). При понижении pH скорость

$$\text{скорость} = k_3 [\text{пром. прод.}] [\text{H}^+] = k_3 \frac{k_1}{k_{-1}} [\text{NH}_2\text{OH}] \left[\text{>C=O} \right] [\text{H}^+] \quad (5)$$

кислотно катализируемой дегидратации увеличивается, однако, когда начинается протонирование свободного гидроксил-амина, равновесная концентрация продукта присоединения начи-

нает падать, причем оба эффекта точно взаимно компенсируются, так что скорость должна перестать зависеть от pH (рис. 1, пунктирная линия). Экспериментальные точки хорошо согласуются с теоретической кривой при уменьшении pH вплоть до 5.

Однако при уменьшении pH ниже 5 экспериментальные константы скоростей становятся *меньше*, чем теоретически вычисленные. Если бы наблюдалось увеличение скорости по сравнению с предсказанной на основании данного кинетического уравнения, то это можно было бы описать просто добавлением к кинетическому уравнению нового члена, соответствующего новому пути реакции. Однако *понижение* скорости означает, что лимитирующей стала какая-то другая стадия и теперь скорость реакции должна описываться новым кинетическим уравнением, соответствующим этой новой стадии. В случае образования оксимов скорость кислотно катализируемой дегидратации промежуточного продукта может настолько возрасти, что превысит скорость его образования из свободного гидроксил-амина и альдегида, так что последняя стадия станет скоростью определяющей для всей реакции. В

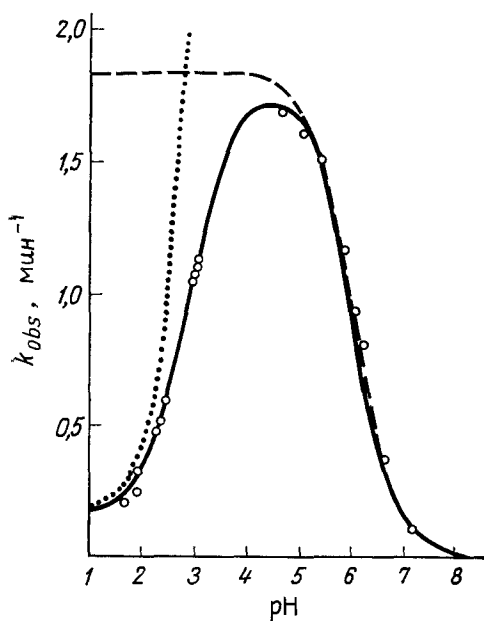


Рис. 1. Влияние pH на константу скорости псевдопервого порядка реакции ацетона ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) с гидроксил-амином (0,0167 моль/л, общ.). При изменении pH происходит смена скорости определяющей стадии [5].

..... скорость атаки ацетона свободным гидроксил-амином; — — — — — скорость реакции в условиях, когда скорость определяющей является кислотно катализируемая дегидратация; ———— скорость, вычисленная по стационарному кинетическому уравнению (7).

этом случае скорость реакции будет пропорциональна концентрации гидроксил-амина в виде свободного основания, которая при низких значениях pH пропорциональна активности ионов гидроксила. Следовательно, скорость этой стадии будет возрастать с ростом pH, как это показано точечной кривой на рис. 1. При очень низких значениях pH скорость реакции опять становится независимой от pH из-за кислотного катализа в реакции присоединения, однако это в настоящий момент несущественно. Кинетическое уравнение,

описывающее эту стадию, имеет вид

$$\text{скорость} = k_1[\text{NH}_2\text{OH}] \left[\text{>C=O} \right] + k_2[\text{NH}_2\text{OH}] \left[\text{>C=O} \right] [\text{H}^+] \quad (6)$$

Во всем интервале значений рН скорость реакции можно описать уравнением (7), полученным методом стационарных концентраций (гл. 11, разд. В) и учитывающим кинетические уравнения стадий присоединения и дегидрата-

$$\text{скорость} = \frac{k_3(k_1 + k_2 a_{\text{H}^+})}{(k_{-1}/a_{\text{H}^+}) + k_{-2} + k_3} [\text{NH}_2\text{OH}] \left[\text{>C=O} \right] \quad (7)$$

ции. Сплошная линия на рис. 1 (теоретическая) построена по ур. (7).

Важным моментом в этой системе является смена скорость определяющей стадии в консеквативной реакции при изменении условий ее проведения. Подобная смена скорость определяющей стадии возможна лишь в том случае, когда реакция включает по крайней мере две последовательные стадии, одна из которых может определять скорость всей реакции при различных условиях. И в свою очередь наличие двух последовательных стадий возможно лишь при существовании промежуточного продукта. В реакции с гидроксил-амином образование промежуточного продукта можно наблюдать непосредственно при высоких значениях рН, однако рассмотренный метод имеет общее значение и может применяться для обнаружения промежуточных продуктов в других реакциях, где они непосредственно не фиксируются. Наиболее вероятной структурой промежуточного продукта присоединения в реакциях карбонильной и ацильной групп является тетраэдрический аддукт; однако возможно, что скорость определяющей стадией может стать перенос протона, и тогда кинетически проявляющимся промежуточным продуктом станут реагенты в ионной форме или другие продукты, которые участвуют в скорости определяющем переносе протона.

Для доказательства применимости этого метода важно показать, что наблюдаемое в определенных условиях уменьшение скорости реакции действительно происходит в результате смены скорость определяющей стадии, а не просто вследствие уменьшения концентрации одного из реагентов или катализатора при изменении экспериментальных условий. Так, при изменении рН необходимо учитывать ионизацию реагентов, и только в том случае, когда уменьшение скорости не связано с ионизацией одного из реагентов, можно считать, что произошла смена скорость определяющей стадии и в реакции существует промежуточный продукт. Аналогично, если изменение скорость определяющей стадии предполагается на основании нелинейного увеличения скорости с ростом концентрации катализатора, необходимо показать, что не происходит комплексобразования катализатора с субстратом или каким-либо другим компонентом реакционной смеси, которое могло бы приводить к запределению скорости. Например, скорость реакции динитрохлорбензола с анилином запределывается с ростом концентрации анилина, что скорее объясняется образованием комплекса между реагентами, чем сменой скорость определяющей стадии реакции [6]. В этом отношении особенно сложен боратный буфер, так как бораты в водном растворе полимеризуются [7], и следует ожидать нелинейной зависимости скорости от концентрации боратного буфера.

Практически известны четыре случая, когда характерная кинетика реакции указывает на возникновение промежуточного продукта, не накапливающегося в заметных количествах. Из них три первые заключаются в нелинейности зависимостей, описывающих скорости реакций, когда отрицательные отклонения в скорости могут быть вызваны изменением скорости определяющей стадии.

1. Отрицательные отклонения в зависимости скорости реакции от рН, которые не вызваны ионизацией одного из реагентов.

2. Отрицательные отклонения в зависимости скорости реакции от концентрации катализатора, которые не вызваны образованием комплекса реагентов с катализатором.

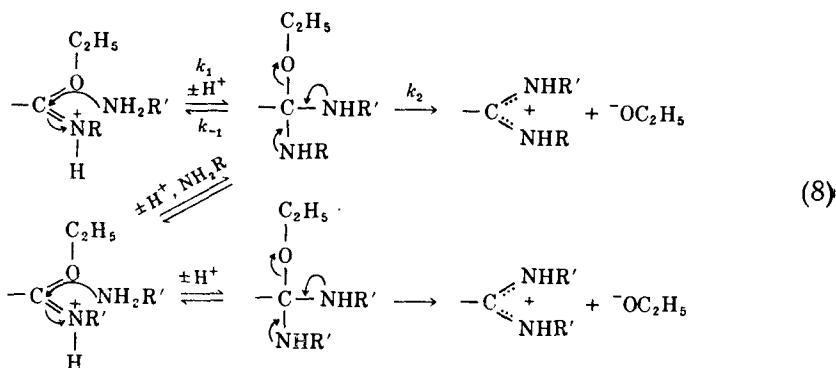
3. Изломы на корреляции между строением и реакционной способностью.

4. Распад промежуточного соединения, возникающего после скорости определяющей стадии по ряду направлений, что приводит к образованию различных конечных продуктов реакции без изменения наблюдаемой скорости исчезновения исходных веществ.

Прежде чем приступить к описанию отдельных реакций карбонильной и ацильной групп, будут рассмотрены примеры каждой из этих ситуаций.

2. СМЕНА СКОРОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ СТАДИИ С ИЗМЕНЕНИЕМ pH

Переход от скорости определяющего кислотно катализируемого распада промежуточного продукта присоединения к скорости определяющей атаке свободным гидроксиламином при уменьшении pH в реакции образования оксима был описан в предыдущем разделе. Аналогичным примером на ацильном уровне окисления служит реакция имидатов * с аминами с образованием амидинов {схема (8)} [8], в которой промежуточный продукт не накапливается в заметных количествах.



Зависимости наблюдаемых констант скоростей реакций ряда аминов с этилбензимидазом и этил-*м*-ниробензимидазом от величины pH представляют собой колоколообразные кривые (рис. 2). Во всех случаях одна или обе ветви pH-зависимости не соответствуют ионизации реагентов, т. е. при изменении pH скорость уменьшается сильнее, чем следует из кинетического уравнения, описывающего реакцию при более высоких или низких значениях pH, что свидетельствует о смене скорости определяющей стадии. Более подробно это показано на рис. 3 для реакции аммиака с этилбензимидазом. На этом рисунке пунктирная кривая соответствует pH-зависимости, ожидаемой для реакции, идущей через переходное состояние, образованное элементами имидата, амина и протоном. При понижении значения pH скорость реакции становится меньше, чем она должна быть при этом переходном состоянии, и подчиняется кинетическому уравнению реакции, идущей через переходное состояние, образованное элементами свободного имидата и амина. Сплошная линия соответствует кинетическому уравнению, найденному методом стационарных концентраций для реакции, в которой происходит смена скорости

* Термином «имидат», который не принят в русской литературе, автор обозначает все возможные соединения с имидной функцией, хотя в тексте чаще всего относят его к имидоэфирам. Во избежание возможной путаницы при переводе мы сочли возможным сохранить терминологию автора. — *Прим. ред.*

определяющей стадии между стадиями, отвечающими двум рассмотренным переходным состояниям.

Несмотря на то что кинетические данные указывают, что здесь происходит смена скорости определяющей стадии и, следовательно, существует промежуточный продукт [как в схеме (8)], на их основании нельзя установить, какая из стадий является скоростью определяющей в каждой области значений pH. В данной реакции это можно сделать при помощи реакции обмена

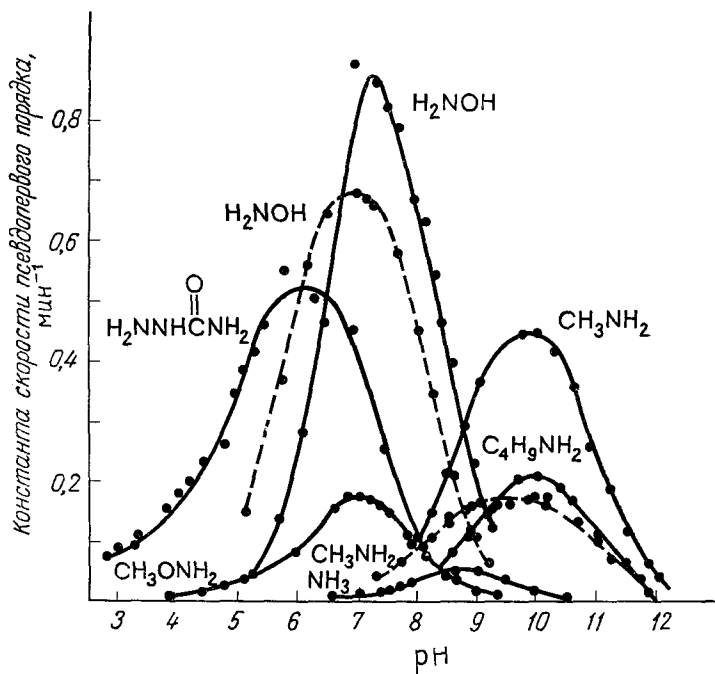


Рис. 2. pH-зависимость скоростей реакций этилбензимидаата (—) и этил-м-нитробензимидаата (-----) с аминами при 25°C и ионной силе 1,0 (*n*-бутиламин при ионной силе 2,0) [8].

следующим образом. Рассмотрим реакцию этил-*N*-метилбензимидаата с большим избытком аммиака [схема (8), $R = CH_3$, $R' = H$]. На той ветви pH-зависимости, где скорость определяющей стадией является первая стадия, а вторая стадия проходит быстро, каждая образующаяся молекула промежуточного продукта присоединения будет немедленно превращаться в конечные продукты, причем единственным продуктом будет монометиламидин. При значениях pH, когда скорость определяющей становится вторая стадия, а первая проходит быстро, промежуточный продукт будет освобождать аммиак и распадаться на исходные вещества по обратимой первой стадии несколько раз, прежде чем превратится в конечные продукты. Однако при этом иногда будет происходить выделение не аммиака, а метиламина с образованием нового незамещенного имидаата. Этот незамещенный имидаат будет вновь взаимодействовать с аммиаком с образованием нового тетраэдрического промежуточного соединения и в качестве конечного продукта реакции будет давать незамещенный амидин. Таким образом, в условиях, когда скорость определяющей становится вторая стадия, должен быстро образовываться незамещенный имидаат и основным конечным продуктом должен быть незамещенный амидин. Именно так происходит в области низких значений pH, в то время как в области высоких значений pH образуется только замещенный амидин, откуда следует, что здесь скорость реакции определяется первой стадией. Рассмотренный случай аналогичен хорошо известному обмену ^{18}O между раствори-

телом и исходными веществами в процессе гидролиза ацильных соединений, причем в роли изотопно меченного кислорода выступает метилированный (меченный метильной группой) амин. В реакции с имидатом исчезновение

реакции обмена при высоких значениях рН позволяет совершенно определенно установить природу скорость определяющей стадии при разных значениях рН.

Для обсуждения природы скорости определяющей стадии реакции следует рассмотреть путь, по которому будет происходить преимущественный распад промежуточного соединения в разных условиях (рис. 4). Если барьер свободной энергии распада промежуточного соединения в одном направлении намного выше, чем в другом, распад по первому пути успеет произойти несколько раз, прежде чем произойдет распад по второму пути с более высоким энергетическим барьером. Другими словами, промежуточное соединение находится в равновесии с веществами, отделенными от него низким энергетическим барьером, а путь через высокий энергетический барьер является скоростью определяющей стадией для всей реакции в любом направлении [уравнение (9)].

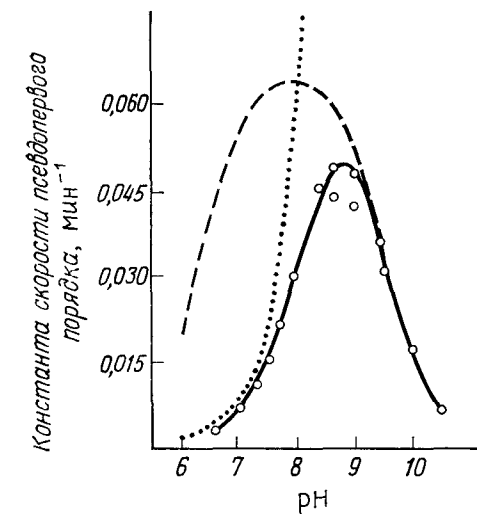
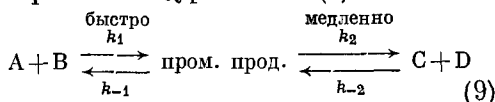


Рис. 3. Взаимодействие аммиака с этилбензимидатом при 25 °С:

----- кривая вычислена для случая, когда скорость определяется атакой амином; кривая вычислена для случая, когда скорость определяется распадом продукта присоединения; — кривая вычислена по стационарному кинетическому уравнению [8].



При изменении более высокого барьера свободной энергии будет происходить изменение скорости всей реакции, в то время как при изменении более низкого энергетического барьера скорость реакции не будет меняться до тех пор,

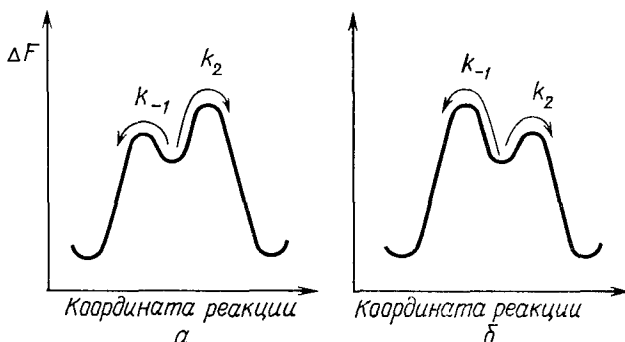


Рис. 4. Энергетические профили реакций, показывающие, каким образом отношение k_2/k_{-1} определяет лимитирующую скорость стадию.

а — вторая стадия лимитирующая, первая стадия в положении равновесия, $k_2 \ll k_{-1}$; б — первая стадия лимитирующая, вторая стадия в положении равновесия, $k_2 \gg k_{-1}$.

пока не изменится также и разность между более высоким барьером и энергией исходных веществ. Здесь важно отметить, что энергетический барьер образования промежуточного соединения из исходных веществ может быть больше, чем барьер для превращения промежуточного соединения в конеч-

ные продукты по скорости определяющей стадии, т. е. какая из стадий лимитирует скорость всей реакции, определяется наивысшей точкой на всем энергетическом профиле реакции, а не самым высоким барьером для какой-то отдельной стадии. Таким образом, в стационарных условиях, когда промежуточный продукт не накапливается, фактором, определяющим, какая из стадий лимитирует скорость реакции, является относительная скорость распада неустойчивого промежуточного продукта в прямом и обратном направлениях, т. е. отношение k_2/k_{-1} , а не относительные скорости образования и распада промежуточного продукта k_1/k_2 . Как всегда, при кинетическом описании важно четко различать константу скорости и абсолютную скорость данной стадии; последняя величина является функцией константы скорости данной стадии, констант скоростей и равновесий предшествующих стадий и концентраций реагентов. Это кажется очевидным, но тем не менее неопределенность относительно смысла «скорость определяющей стадии» постоянно приводит к путанице при описании механизмов реакций. С этой точки зрения более строго было бы приписать смену скорость определяющей стадии с понижением pH при образовании оксима увеличению скорости кислотно катализируемой стадии k_2 по сравнению с некатализируемой стадией k_{-1} , а не изменению относительных скоростей стадий k_1 и k_2 [схема (8)].

При аминолизе имидатов при низких значениях pH вытеснение спирта через незаряженное переходное состояние происходит медленно, а кислотно катализируемое присоединение и отщепление амина происходят быстро, так что скорость определяется второй стадией и энергетический профиль реакции соответствует изображенному на рис. 4, а. При высоких значениях pH скорость определяющей является атака амином протонированного имидата, а вытеснение спирта происходит быстро, так что промежуточное соединение превращается в конечные продукты значительно чаще, чем распадается на исходные вещества, и энергетический профиль реакции соответствует приведенному на рис. 4, б. При значениях pH ~ 8 , при которых происходит смена скорость определяющей стадии, происходит переход между этими энергетическими профилями. Таким образом, можно утверждать (диаграмма 1), что при значениях pH < 8 в тетраэдрическом промежуточном продукте аминолиза имидатов протонирование азота и вытеснение свободного амина преобладают над протонированием кислорода и вытеснением свободного спирта,

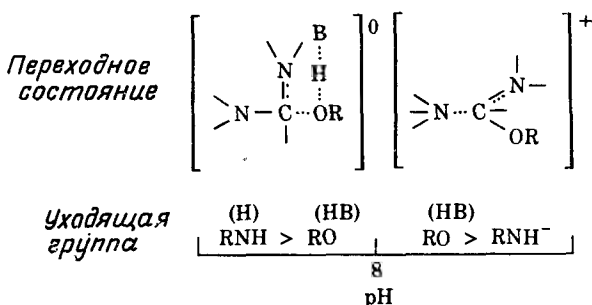


Диаграмма 1

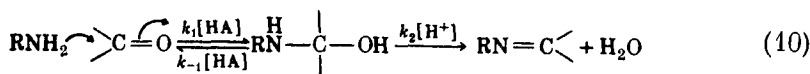
а при значениях pH > 8 вытеснение иона алкоголята преобладает над вытеснением аниона амина. Это находится в соответствии с тем, чего можно было бы ожидать на основе химической интуиции.

Диаграммы такого типа удобны для представления преобладающей уходящей группы и смены скорость определяющей реакции как функции pH. Протон [(H) или (HB)] в круглых скобках указывает на то, что для вытеснения группы при данном значении pH к ней должен быть прибавлен протон, так что скорость удаления группы будет зависеть как от легкости ухода группы, так и от легкости ее протонирования. Переходное состояние для скорость

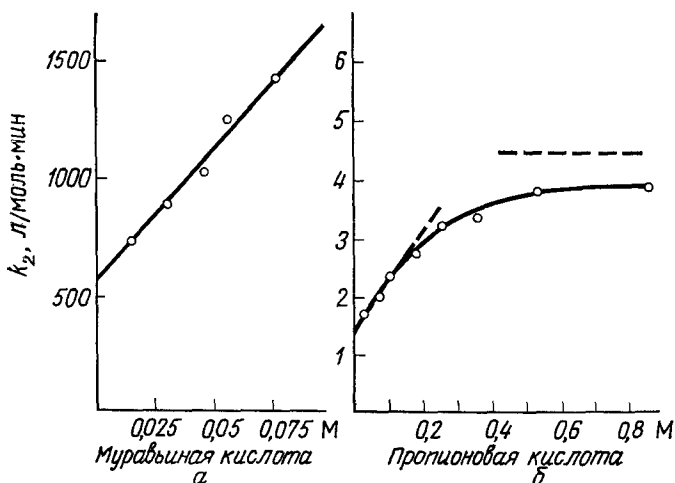
определяющей стадии показано над той областью рН, в которой это промежуточное состояние является преимущественным. Общий заряд переходного состояния по сравнению с общим зарядом реагентов определяет рН-зависимость реакции в каждой области рН: если реагенты в целом незаряжены, а переходное состояние имеет положительный заряд, реакция будет кислотно катализируемой; если же положительно заряжены и реагенты, и переходное состояние, наблюдаемая скорость реакции не будет зависеть от рН. Вертикальными штрихами на шкале рН отмечены переходы скорости определяющей стадии, сопровождающие изменения заряда переходного состояния. Это должно приводить к отрицательным отклонениям зависимости рН — скорость реакции. Положительные отклонения этой же зависимости вызываются *дополнительными* путями для данной стадии и происходят в тех случаях, когда возникают переходные состояния с другими общими зарядами. Возможность построения такой диаграммы для любой реакции ациальной группы позволила бы в общем случае описать природу и характер изменения скорости определяющей стадии с изменением рН, а также прийти к некоторым общим выводам относительно механизма этих реакций. В настоящее время это невозможно, так как исследователи находятся лишь в начальном периоде построения более сложной схемы.

3. СМЕНА СКОРОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ СТАДИИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕОСНОВНОГО ИЛИ ОБЩЕКИСЛОТНОГО КАТАЛИЗАТОРА

Примером такой ситуации в простой реакции может служить образование семикарбазонов из семикарбазида и карбонильных соединений {схема (10)} [9].



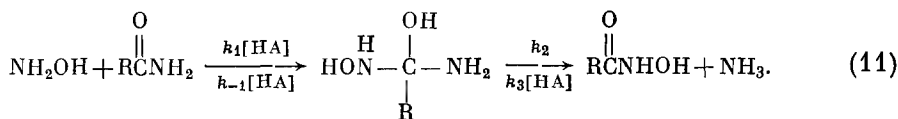
Взаимодействие свободного амина с карбонильной группой в этой реакции ускоряется под действием общекислотных катализаторов, в то время как стадия дегидратации незначительно катализируется общими кислотами



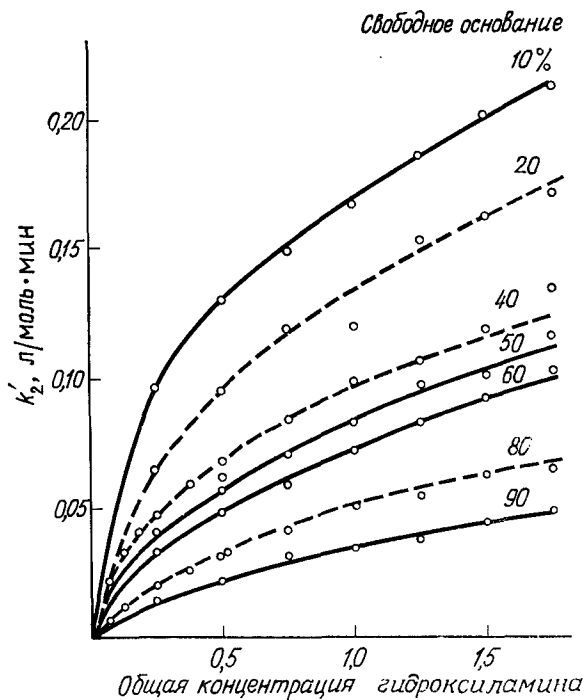
Р и с. 5. а — общий кислотный катализ образования семикарбазона *n*-нитробензальдегида при рН 3,27 муравьиной кислотой; б — общий кислотный катализ образования семикарбазона ацетофенона при рН 4,10 пропионовой кислотой. Горизонтальная штриховая линия соответствует скорости дегидратации карбиноламина при этом рН [9].

(т. е. для этой стадии $\alpha \approx 1,0$). Здесь можно точно указать скорость определяющую стадию реакции, так как накопление промежуточного продукта присоединения можно наблюдать непосредственно в нейтральной области рН, где скорость дегидратации мала. При низких значениях рН скорость определяется катализируемой общими кислотами атакой карбонильной группы амином, и при рН 3,27 скорость реакции линейно возрастает с ростом концентрации муравьиной кислоты (рис. 5, а). При большем значении рН 4,1, вблизи области рН, в которой происходит смена скорости определяющей стадии, скорость возрастает с ростом концентрации пропионовой кислоты при низких концентрациях катализатора, а затем происходит запределение роста скорости, так как катализатор делает скорость первой стадии настолько быстрой, что скорость дегидратации отстает от нее и скорость определяющей становится вторая стадия. При этом наблюдаемая скорость реакции приближается к скорости дегидратации, показанной на рис. 5, б пунктирной линией.

Примером того же явления в реакции на ацильном уровне окисления, когда нельзя наблюдать накопление промежуточного продукта присоединения, служит реакция амидов с гидроксиламином с образованием гидроксамовых кислот {схема (11)} [10].



В этой реакции проявляется общекислотный катализ гидроксилламмониевым ионом, поэтому скорость реакции возрастает с ростом концентрации гидроксилламмониевого буфера быстрее, чем по линейной зависимости, и при изменении рН проходит через максимум вблизи рК гидроксилламина. Зависимость экспериментальной константы скорости реакции второго порядка ($k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$) от концентрации буфера показана на рис. 6. Усиление катализа с уменьшением рН отражает тот факт, что каталитически активной частицей является ион гидроксилламмония. При низких концентрациях буфера происходит резкое увеличение скорости с ростом концентрации катализатора, однако при дальнейшем росте концентрации катализатора происходит изгиб кривых, т. е. скорость продолжает возрастать, но уже гораздо слабее зависит от концентрации катализатора. Это указывает на переход от скорости



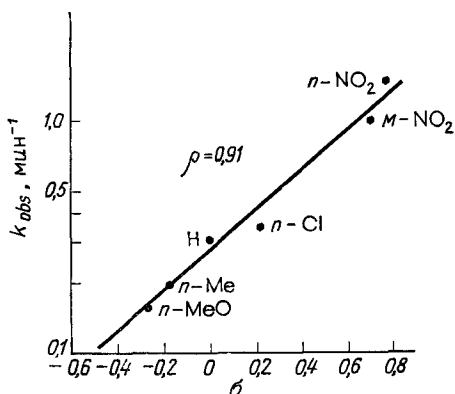
Р и с. 6. Зависимость константы скорости второго порядка образования формгидроксамовой кислоты ($k'_2 = k_{\text{obs}}/[\text{NH}_2\text{OH}]$) от концентрации гидроксилламина при различной доле свободного основания, ионной силе 2,0 и 39°C. Штриховые кривые вычислены по стационарному кинетическому уравнению [10].

определяющей стадии, сильно зависящей от концентрации катализатора, к скорости определяющей стадии слабо от нее зависящей. Точнее, в кинетическом уравнении существует значительный член, соответствующий стадии, становящейся скоростью определяющей при высоких концентрациях катализатора, который отвечает некатализируемой или катализируемой водой реакции. Пунктирные кривые на этом рисунке вычислены теоретически по стационарному кинетическому уравнению для реакции, в которой происходит такая смена скорости определяющей стадии.

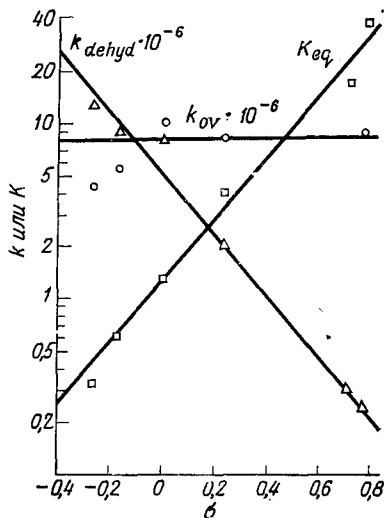
Из кинетических данных следует, что происходит смена скорости определяющей стадии, однако они не позволяют установить, какая стадия определяет скорость реакции при различных концентрациях катализатора. Одна из возможных ситуаций, когда атака гидроксиламином идет по механизму общекислотного катализа (α велик), а удаление и присоединение более основного амина менее чувствительны к кислотному катализу и в значительной степени идут только с участием воды (α мал), показана на схеме (11). Однако кинетика также удовлетворительно соответствует механизму, в котором первая стадия может идти как каталитически, так и некаталитически, а вторая стадия идет только как кислотно катализируемая.

4. СМЕНА СКОРОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ СТАДИИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СТРУКТУРЫ РЕАГЕНТОВ

Чтобы произошла смена скорости определяющей стадии при изменении pH или концентрации катализатора, необходимо наличие двух последовательных стадий, подчиняющихся различным кинетическим уравнениям, т. е.



Р и с. 7. Логарифмическая зависимость скорости образования семикарбазонов из ряда замещенных бензальдегидов в 25%-ном этаноле при pH 1,75 от параметра Гаммета σ [11].



Р и с. 8. Влияние строения реагента на отдельные стадии образования семикарбазонов из замещенных бензальдегидов в 25%-ном этаноле при нейтральном значении pH.

□ константы равновесия образования продукта присоединения; Δ константы скорости кислотно катализируемой дегидратации; $\circ$ (горизонтальная линия) скорость всей реакции [11].

обладающих переходными состояниями с различным стехиометрическим составом, причем эта смена служит убедительным доказательством существования между этими стадиями промежуточного продукта. Отрицательное от-

клонение в нелинейной корреляции между структурой и реакционной способностью может быть вызвано сменой скорости определяющей стадии в двухстадийной реакции, когда скорости этих стадий по-разному зависят от структуры реагентов, однако это может быть также следствием непрерывного изменения природы переходного состояния при изменении структуры реагентов в реакции, где отсутствует промежуточный продукт.

Образование семикарбазонов представляет собой простую двухстадийную реакцию, в которой природа скорости определяющей стадии при разных условиях известна из других данных. При низких значениях pH, когда скорость определяется атакой альдегида семикарбазидом, скорость реакции в ряду замещенных бензальдегидов возрастает при введении электроноакцепторных заместителей в молекулу альдегида и наблюдается линейная корреляция с параметром Гаммета σ , как показано на рис. 7 [11]. При нейтральных значениях pH, когда скорость определяется стадией дегидратации, наблюдаемая скорость почти не зависит от природы заместителей (рис. 8, горизонтальная линия). Это объясняется тем, что благоприятное влияние электронодонорных заместителей на скорость кислотно катализируемой дегидратации промежуточного продукта присоединения ($\rho = -1,74$) почти полностью уничтожается неблагоприятным влиянием этих же заместителей на равновесную концентрацию промежуточного продукта ($\rho = 1,81$), так что наблюдаемая скорость, которая зависит от обеих стадий, почти не зависит от σ . При промежуточном значении pH 3,9, когда происходит смена скорости определяющей стадии, на корреляции между структурой и реакционной способностью наблюдается излом, так как для альдегидов с электронодонорными заместителями скорость определяется сильно зависящей от структуры первой стадией присоединения, в то время как для альдегидов с электроноакцепторными заместителями первая стадия проходит быстро и скорость определяется второй стадией дегидратации (рис. 9).

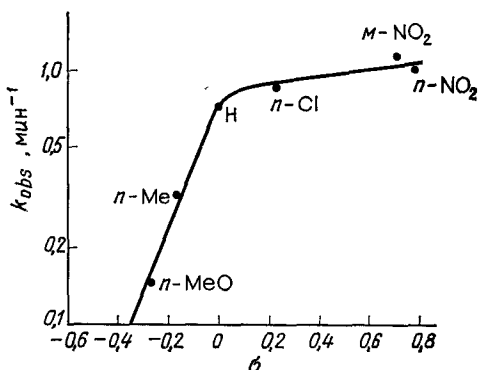
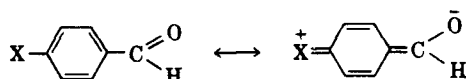


Рис. 9. Гамметовская зависимость для скорости образования семикарбазонов из ряда замещенных бензальдегидов в 25%-ном этаноле при pH 3,9; излом на кривой вызван сменой скорости определяющей стадии [11].

Следует проявлять осторожность при подобной интерпретации в случае, когда наблюдаемые изменения скорости реакции невелики, так как небольшие отклонения от линейности в корреляции Гаммета могут быть вызваны иными причинами, не связанными с изменением природы скорости определяющей стадии. Одной из возможных причин может быть неполное взаимное уничтожение эффектов заместителей на две стадии реакции, когда вторая стадия является скоростью определяющей. Так, при образовании азотистых производных карбонильных соединений в условиях, когда скорость определяется стадией дегидратации, скорость этой стадии коррелирует с σ , в то время как константы равновесия стадии присоединения в некоторой степени отклоняются к корреляции с σ^+ . Шкала σ^+ описывает реакции, в которых существенна подача электронов к реакционному центру за счет резонанса, и это имеет место в случае альдегидов, которые стабилизируются подобным резонансом (III).

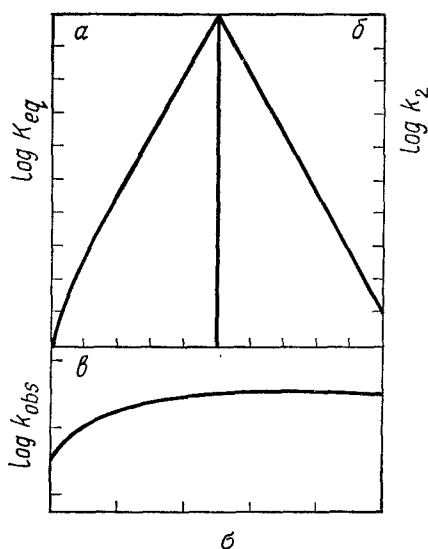
Вызываемые этим отклонения от обычной линейной гамметовской зависимости, по-видимому, не очень значительны для равновесного присоединения на первой стадии из-за крутого наклона зависимости и вследствие того, что

константы равновесия изменяются в пределах нескольких порядков. Наблюдаемые константы скорости реакции лишь незначительно зависят от заместителя благодаря взаимному уничтожению эффектов заместителей в обеих стадиях, но если эти константы рассмотреть в широком интервале значений, то

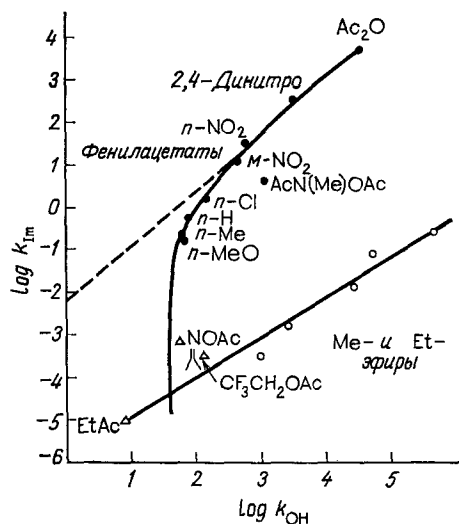


III

становится заметнее отрицательное отклонение констант для соединений с электронодонорными заместителями, которые сильнее влияют на равновесие, чем на стадию дегидратации. Подобное явление, схематически показанное на



Р и с. 10. Схематическое изображение того, как небольшое отклонение от линейности на гамметовской зависимости одной из стадий двухстадийной реакции вызывает отрицательное отклонение на гамметовской зависимости k_{obs} , которая зависит как от K_{eq} , так и от k_2 . Следует учесть, что масштаб по осям ординат и абсцисс для k_{obs} увеличен вдвое [36].

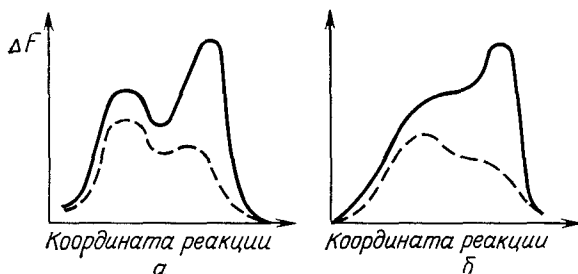


Р и с. 11. Зависимость скоростей гидролиза сложных эфиров, катализируемого имидазолом, от скорости их щелочного гидролиза. ● нуклеофильные реакции ацетатов; Δ общесосновой катализ гидролиза ацетатов; ○ общесосновой катализ гидролиза метиловых и этиловых эфиров (ионная сила 1,0; 25 °C). Скорость гидролиза трифторэтилацетата измерена для N-метилимидазола [12].

рис. 10, можно ошибочно принять за доказательство смены скорость определяющей стадии, если не проанализировать его достаточно тщательно. Этим же явлением в совокупности с некоторым разбросом экспериментальных данных можно объяснить отрицательное отклонение констант скорости для *n*-метилбензальдегида и *n*-метоксибензальдегида на рис. 8.

Примером смены скорости определяющей стадии при изменении структуры на ацильном уровне окисления может служить нуклеофильная реакция имидазола с рядом эфиров уксусной кислоты [12]. Есть основания полагать, что реакция иона гидроксила с этими эфирами идет по тому же механизму, причем стадия нуклеофильной атаки главным образом или полностью определяет скорость реакции, так что константа скорости реакции с ионом гидроксила является мерой реакционной способности эфира к нуклеофильной атаке. Если построить логарифмическую зависимость констант скоростей реакций

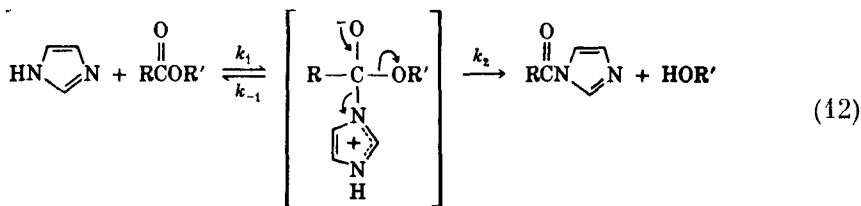
этих эфиров с имидазолом от констант скоростей их реакций с гидроксидом, для соединений с хорошими уходящими группами, таких, как уксусный ангидрид, 2,4-динитрофенилацетат и *n*-нитрофенилацетат, наблюдается линейная корреляция (рис. 11). У этих соединений отщепление уходящей группы происходит легко, и можно ожидать, что скорость определяющей стадией является атака эфира имидазолом [схема (12), k_1]. Когда уходящие группы



Р и с. 12. Энергетический профиль:

а — реакции с неустойчивым промежуточным продуктом; б — реакции, в которых нет промежуточного продукта [12].

в ряду замещенных фенилацетатов становятся хуже, скорости реакций с имидазолом отклоняются вниз от прямой линии, полученной для более реакционноспособных соединений. Для эфиров с еще более худшими уходящими группами, таких, как трифторэтилацетат и этилацетат, отрицательные отклонения достигают величины нескольких порядков. На самом деле отклонение даже еще больше, чем показано на рис. 11, так как наблюдаемые скорости реакций имидазола с этими соединениями скорее соответствуют общесновному катализу, чем нуклеофильной реакции. Точки, отвечающие этим соединениям, попадают на нижнюю прямую, которая соответствует скоростям катализируемого имидазолом гидролиза ряда ацилзамещенных этиловых и метиловых эфиров, где имидазол выступает в качестве общесновного катализатора. Отрицательное отклонение указывает на изменение природы скорость определяющей стадии, когда уходящая группа становится достаточно плохой, причем это можно интерпретировать как переход к скорости определяющей стадии, подобной распаду тетраэдрического промежуточного продукта присоединения [схема (12), k_2].



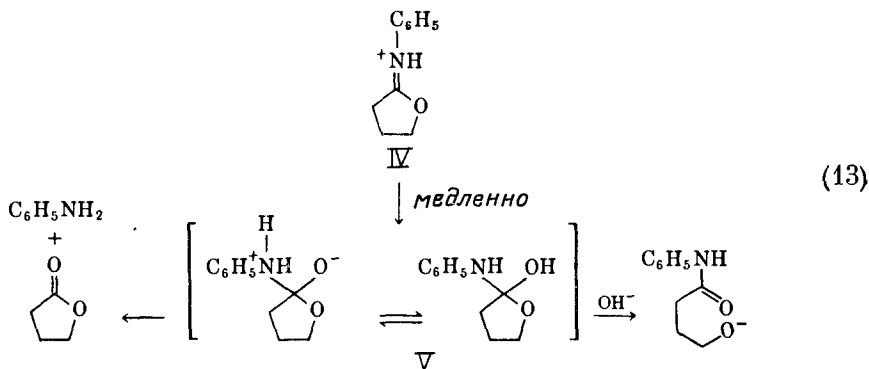
Такую корреляцию для нуклеофильных реакций имидазола можно рассматривать как более или менее количественное выражение того факта, что слабый нуклеофил не в состоянии вытеснить плохую уходящую группу. Когда уходящая группа становится достаточно плохой, промежуточный продукт присоединения (если он вообще образуется) будет распадаться, освобождая имидазол, а не уходящую группу и давая исходные вещества, а не конечные продукты реакции. При этом произойдет излом на корреляции между структурой и реакционной способностью. Результаты такого типа указывают

на значительное изменение природы переходного состояния при изменении структуры реагентов, однако их можно интерпретировать как с точки зрения двухстадийного протекания реакции, так и с точки зрения согласованного механизма реакции с асимметричным переходным состоянием. Реакции, в которых существует промежуточный продукт, могут быть описаны кривыми, приведенными на рис. 12, а, где пунктирная и сплошная линии относятся к соединениям с хорошей и плохой уходящими группами соответственно. Однако они также могут быть описаны кривыми, приведенными на рис. 12, б, которые скорее описывают асимметричное переходное состояние, чем промежуточный продукт. Другими словами, тетраэдрический продукт присоединения в уравнении (12) может оказаться скорее переходным состоянием, чем промежуточным продуктом. Из-за возможности интерпретации нелинейных корреляций между структурой и реакционной способностью как с точки зрения изменений в симметрии переходного состояния, так и наличия промежуточного продукта подобные корреляции не могут служить убедительным доказательством существования промежуточного продукта на координате реакции.

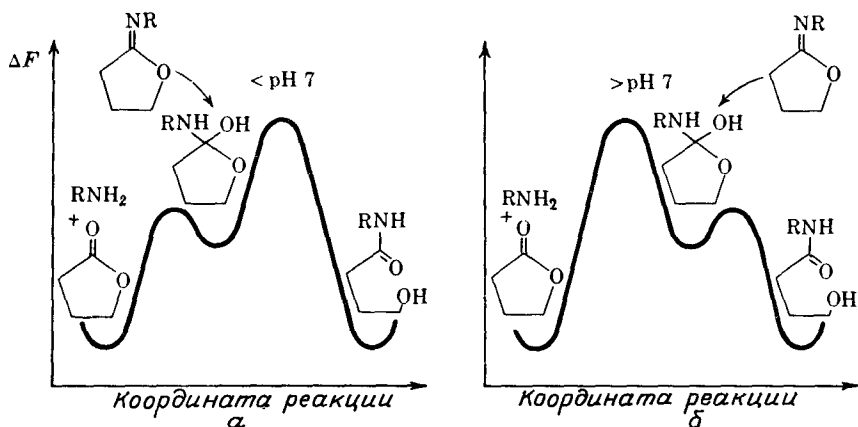
Б. РАСПАД ПРОМЕЖУТОЧНОГО ПРОДУКТА, ВОЗНИКАЮЩЕГО ПОСЛЕ СКОРОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЮЩЕЙ СТАДИИ ПО РЯДУ НАПРАВЛЕНИЙ

Другой способ доказательства существования в реакции промежуточного продукта заключается в демонстрации изменения конечных продуктов реакции при изменении условий ее проведения с постоянной скоростью. В качестве примера рассмотрим гидролиз N-фенилиминолактона (IV) [схема (13)], который уже обсуждался в гл. 3, разд. Г, 5. Вблизи нейтрального значения pH *скорость* гидролиза этого соединения подчиняется одному кинетическому уравнению, однако в качестве *продуктов* реакции образуются аниlid при pH 7 и лактон и анилин при pH < 7; выход лактона можно также увеличить повышением концентрации бифункционального кислотно-основного катализатора в переходной области pH [13]. Таким образом, переходное состояние по крайней мере для одного из путей реакции должно быть иным, чем для скорости определяющей стадии, и должно существовать промежуточное соединение V, которое в состоянии превращаться в два разных продукта в зависимости от условий проведения реакции и без изменения ее скорости.

Особенно важное следствие этого явления заключается в том, что оно показывает, каким образом может идти распад тетраэдрического промежуточного продукта в разных условиях, и, следовательно, делает возможным определение скорости определяющей стадии и реакции переноса ацильной группы, идущих через тот же промежуточный тетраэдрический продукт. Нижняя реакция в схеме (13), рассматриваемая слева направо, представляет



с собой аминолиз сложного эфира анилином. Анализ продуктов, полученных при гидролизе фенилиминолактона, показывает, что при значениях $\text{pH} < 7$ энергетический барьер распада промежуточного продукта V на лактон и анилин меньше, чем барьер для превращения в анилид (рис. 13, а). Таким образом, если тот же промежуточный продукт образуется при аминолизе лактона, он будет распадаться на исходные вещества чаще, чем превращаться



Р и с. 13. Схема распада имидата с образованием того же тетраэдрического промежуточного продукта, что и при аминолизе. Это может быть использовано для установления скорости определяющей стадии в аминолизе.

в продукты, и превращение в продукты будет скорость определяющей стадией. При значениях $\text{pH} > 7$ энергетический барьер превращения промежуточного соединения V в анилид меньше, чем барьер для его распада до лактона, как это следует из анализа продуктов гидролиза фенилиминолактона при этих условиях (рис. 13, б). Следовательно, в реакции аминолиза то же промежуточное соединение будет чаще превращаться в конечные продукты, чем распадаться на исходные вещества, и скорость определяющей будет стадия его образования. Большое удобство экспериментов такого типа для интерпретации роли промежуточного продукта присоединения в реакциях переноса ацильной группы состоит в том, что они позволяют создавать промежуточные продукты из соединений, которые отсутствуют при обычном течении реакции, и устанавливать характер поведения этих промежуточных продуктов из простого анализа конечных продуктов их распада в различных условиях. На основании данных по распаду N-фенилиминолактона можно описать различные способы превращения другого тетраэдрического промежуточного продукта как функцию pH (диаграмма 2). Эта шкала мало отличается от шкалы для промежуточного продукта при аминолизе

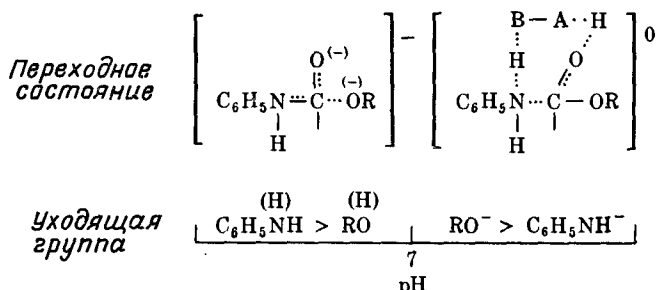


Диаграмма 2

имидатов, за исключением разницы в структурах промежуточных продуктов и основностях аминов обеих реакций.

При этом рассмотрении важно одно допущение, которое может не выполняться для всех реакций, а именно что *перенос протона происходит гораздо быстрее, чем превращение промежуточного продукта присоединения*, т. е. что различные ионные формы промежуточного продукта находятся в быстро устанавливаемом равновесии. Если это не так, а, по-видимому, в некоторых реакциях это действительно не так, ионные формы промежуточного продукта могут в разных реакциях оказаться неодинаковыми, так что может не существовать общего промежуточного продукта и наблюдаемые свойства промежуточного продукта в одной реакции могут не отражать свойств ионной формы этого промежуточного продукта в другой реакции. Наоборот, установление разницы в свойствах промежуточного продукта в двух реакциях может служить доказательством медленной стадии переноса протона.

Непосредственное наблюдение образования ацильного соединением тетраэдрического продукта присоединения еще не является убедительным доказательством, что это или подобное промежуточное соединение действительно возникает на пути данной реакции, так как оно может возникнуть и в результате побочного процесса. Кинетические критерии обладают тем преимуществом, что позволяют установить существование промежуточного продукта на основном пути реакции, так как наличие побочной реакции не должно оказывать влияния на кинетику до тех пор, пока не станет заметной убыль исходных веществ в результате образования большого и легко определяемого количества побочного продукта.

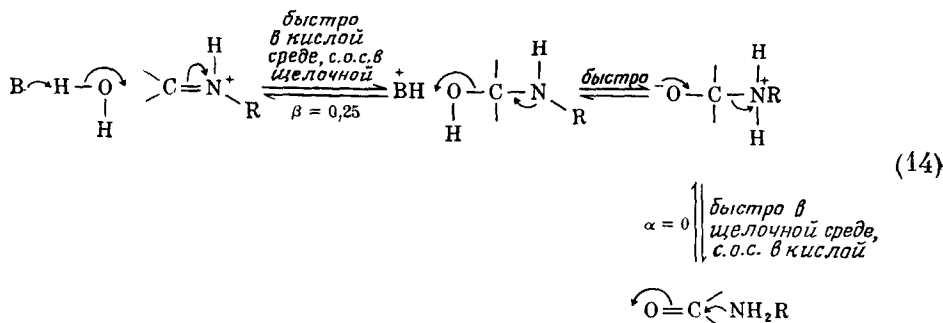
То, что колоколообразные рН-зависимости скоростей реакций и другие изгибы на этих зависимостях могут возникать как в результате смены скорости определяющей стадии, так и в результате ионизации реагентов, означает, что нельзя все эти кривые объяснять ионизацией реагентов. Этот вывод особенно важен для ферментативных реакций, в которых точки перегиба на колоколообразных рН-зависимостях скоростей принято приписывать ионизации групп активного центра фермента, если их нельзя приписать ионизации субстратов. Уменьшение скорости гидролиза фосфатных эфиров, катализируемого щелочной фосфатазой из *E. coli* с уменьшением рН, можно объяснить ионизацией группы активного центра с $pK \sim 7$, однако в действительности это вызвано заменой скорость определяющей стадии фосфорилирования фермента при высоких значениях рН на скорость определяющую стадию дефосфорилирования при более низких значениях рН [14]. Вероятно, в дальнейшем будут обнаружены и другие ферментативные реакции, в которых изменение скорости при изменении рН скорее связано со сменой скорость определяющей стадии, а не с ионизацией групп активного центра; это особенно вероятно ввиду многостадийности ферментативных реакций.

Б. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

В этом разделе собраны сведения для ряда реакций карбонильной и ацильной групп относительно роли тетраэдрического промежуточного продукта, скорость определяющей стадии и механизма общего кислотно-основного катализа. Критерии, по которым устанавливается механизм этих реакций, были описаны более подробно в предыдущем разделе и в гл. 3. Большинство выводов суммировано в виде диаграмм типа 1 и 2, а также в виде таблицы в конце главы. Сначала будут рассмотрены реакции карбонильной группы, так как они сравнительно просты и могут служить моделями для более сложных реакций ацильной группы.

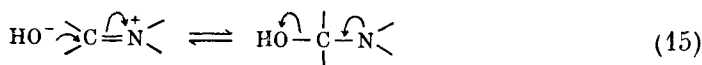
1. >C=O и RNH_2

Реакции образования и гидролиза азотистых производных карбонильных соединений можно разбить на два типа: реакции с сильноосновными аминами, такими, как алифатические амины и гидроксилламин, и реакции со слабоосновными аминами, такими, как семикарбазид и анилин. Смена скорости определяющей стадии в реакциях первого типа, как правило, происходит при значениях pH 2...5 [5,15—17]. При более низких значениях pH присоединение и отщепление воды происходят быстро и скорость определяется присоединением и отщеплением свободного амина [схема (14)]. При больших



значениях pH быстро происходит присоединение и отщепление свободного амина и скорость определяется присоединением и отщеплением воды или иона гидроксила. Активной частицей является протонированный или катионный амин. pH перехода понижается с ростом электроноакцепторности заместителей при карбонильной группе, так как оттягивание электронов препятствует протонированию и отщеплению OH из промежуточного продукта через положительно заряженное переходное состояние в большей степени, чем отщепление амина через незаряженное переходное состояние.

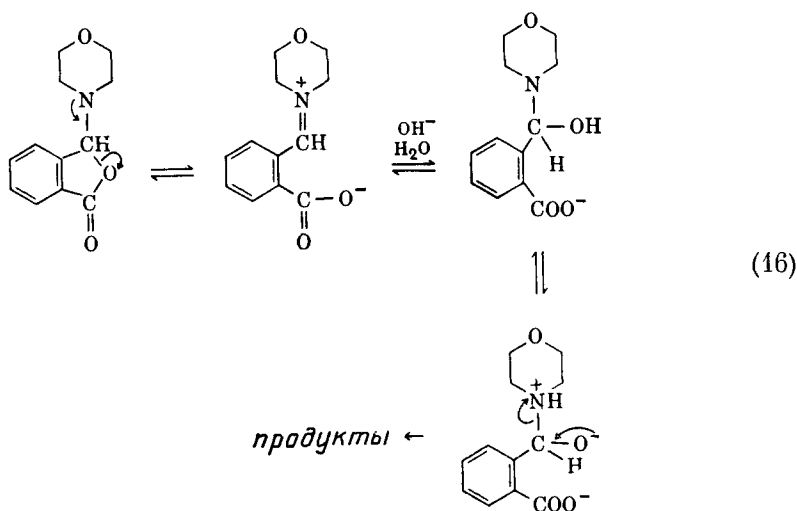
Атака катионного имина водой идет по механизму истинного общесосновного катализа, а удаление иона гидроксила из промежуточного продукта — по механизму общеионного катализа. На это указывает тот факт, что катализ наблюдается для катионных и полностью протонированных аминов (гл. 3, разд. В,1,2). Величина β равна приблизительно 0,25, а величина α — приблизительно 0,75. Это значит, что протон в переходном состоянии находится рядом с атомом кислорода [16, 18]. Константа скорости атаки катионного имина ионом гидроксила оказывается намного выше предсказываемой из брэнстедовской зависимости для общесосновного катализа [18]. Это указывает на то, что реакция с гидроксильным ионом скорее является прямой нуклеофильной атакой [схема (15)], чем катализируемой ионом гидроксила атакой водой



Аналогичная, не зависящая от pH , реакция была обнаружена при образовании оксимов и нитронов из алифатических альдегидов и ацетона, однако она не была обнаружена в реакциях гидроксилламина с ароматическими карбонильными соединениями [19, 20]. Тот факт, что общий кислотно-основной катализ в этих реакциях сохраняет свои характерные черты, если атом водорода при азоте заместить алкильной группой, означает, что циклический или согласованный механизм, который включает перенос протона к атому или от атома азота, для этих реакций несуществен. Атака свободного имина водой

или ионом гидроксила характеризуется невысокой константой скорости. Атака иминной группы даже такими высокореакционноспособными нуклеофилами, как ион боргидрида, требует предварительного протонирования с образованием катионного имина. Однако в реакции с менее основным гидроксиламином существует основно катализируемый путь дегидратации, который может представлять собой специфический или общесловной катализ отщепления иона гидроксила [11].

Присоединение и отщепление замещенного кислорода, как это происходит при гидролизе аддукта морфолина по схеме (16), можно объяснить тем же механизмом с нейтральным переходным состоянием. Особый характер pH-зависимости скорости этой реакции при низких значениях pH [21] можно отнести за счет увеличения скорости гидролиза имина вследствие атаки катионного переходного состояния водой и ингибирования кислотой, вызванного необходимостью существования биполярной структуры переходного состояния для вытеснения амина, хотя это объяснение не было доказано.



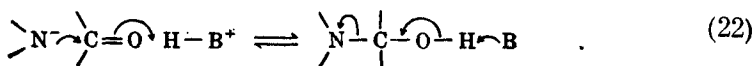
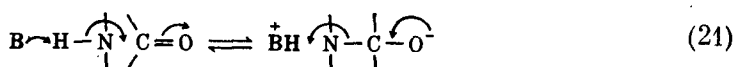
Перенос протона в промежуточном продукте с образованием цвиттер-иона [схема (14)] должен происходить внутримолекулярно и экстремально быстро; постадийный перенос протона не будет происходить достаточно быстро, чтобы этим объяснить наблюдаемую скорость реакции [16]. Этот перенос протона может согласовываться с атакой карбонильной группы амином. Однако атака алкиламинами не катализируется добавленными кислотами и основаниями. Это значит, что для атаки карбонильной группы этими и другими сильноосновными нуклеофилами $\alpha = 0$. Атака менее основным гидроксиламином в очень небольшой степени катализируется протоном [5, 22, 23], однако общекислотный катализ до сих пор не был обнаружен для этой реакции. Наоборот, отсутствие в обратной реакции кислотного катализа при вытеснении амина объясняет торможение скорости гидролиза имина в кислом растворе. Электронная пара на нейтральном атоме кислорода

в частице $R_3\dot{N} - \overset{\textstyle |}{\underset{\textstyle |}{C}} - OH$ не создает достаточной движущей силы для вытеснения сильноосновного амина, поэтому распад промежуточного продукта происходит только через дипольную форму частицы $R_3\dot{N} - \overset{\textstyle |}{\underset{\textstyle |}{C}} - O^-$. В кислом растворе реакция ингибируется вследствие того, что концентрация дипо-

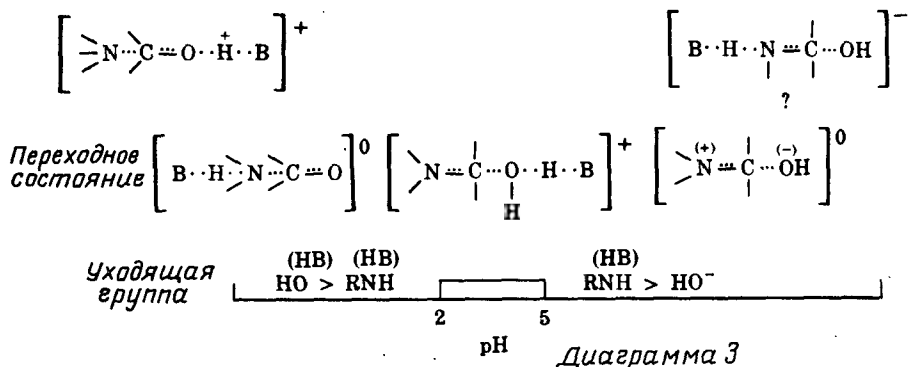
в условиях, когда скорость определяется стадией дегидратации, приводили как доказательство специфического основного катализа на стадии дегидратации [19], однако неопределенности в эксперименте и теории относительно величины изотопного эффекта в реакциях, включающих перенос протона этого типа, делают его интерпретацию неубедительной.

Тот факт, что при атаке карбонильной группы слабоосновными аминами имеет место общекислотный катализ с величиной $\alpha \sim 0,25$ [23, 31], также согласуется с ожидаемой зависимостью между строением и реакционной способностью. Наоборот, для вытеснения более электрофильного амина из продукта присоединения не требуется полной энергии алкоксидного иона, и оно происходит по механизму общеосновного катализа с величиной $\beta \sim 0,75$. Величина α для атаки ацетальдегида еще менее основной молекулой мочевины равна 0,45 [17, 32]. Для осуществления альтернативного механизма этой стадии, включающего предравновесное протонирование карбонильной группы, константа скорости атаки амином должна быть больше, чем константа скорости реакции, лимитируемой диффузией (гл. 3, разд. В.3). Существует возможность катализа на этой стадии по согласованному механизму или механизму «одного столкновения», особенно для очень слабоосновных аминов.

Амины с электроноакцепторными заместителями, такие, как амиды, мочевины и тиомочевины, взаимодействуют с карбонильными соединениями по механизму общеосновного катализа [33]. Этот путь, вероятно, важен и в других реакциях конденсации относительно кислых аминов, однако он маскируется тем, что скорость определяющей стадией реакции в условиях, когда основной катализ был бы значителен, является дегидратация. Реакция может идти по механизмам, показанным схемами (21) и (22), а также по согласованному механизму или механизму «одного столкновения». То, что общекислотный катализ не наблюдается при атаке нуклеофилами, менее основными, чем анионы амидов, такими, как цианид, сульфит и свободные амины, указывает на меньшую вероятность механизма по уравнению (22) в соответствии с предсказанием из корреляции между строением и реакционной способностью (гл. 3, разд. В.4).



Предпочтительный способ распада промежуточного продукта присоединения в этих реакциях при различных значениях pH, определяющий лимитирующую скорость стадию, показан на диаграмме 3



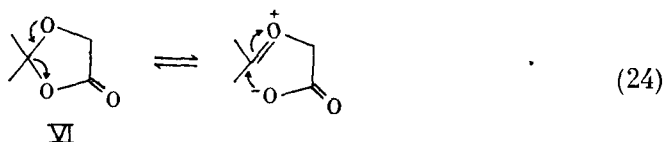
Следует отметить, что движущую силу вытеснения кислорода создает электронная пара на амине и наоборот, что константа равновесия изомеризации неполярного промежуточного соединения в биполярное может влиять на направление его распада, так что направление распада зависит не только от относительной легкости удаления возможных уходящих групп. Поэтому тип распада этих промежуточных продуктов присоединения нельзя непосредственно использовать для предсказания характера распада тетраэдрических промежуточных продуктов в реакциях ацильных соединений.

2. $>C=O$ и RON

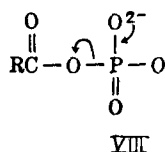
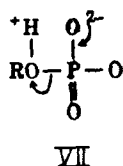
Обратимая гидратация карбонильных соединений происходит по механизмам и общекислотного, и общесосновного катализа [2]. Вероятно, оба эти пути включают согласованный механизм или механизм «одного столкновения», как это обсуждалось в гл. 3, так что нет необходимости в энергетически неблагоприятном образовании свободного оксониевого иона или промежуточного продукта, содержащего анионный кислород. При присоединении и отщеплении спиртов и других подобных соединений также происходит общий кислотно-основной катализ, и, вероятно, эти процессы идут по таким же механизмам, как и гидратация [34, 35]. При кислотно катализируемом гидролизе ацеталей отсутствует непосредственная реакция с водой и обнаруживается лишь незначительный или исчезающе малый общий кислотный катализ {схема (23)} [36, 37]



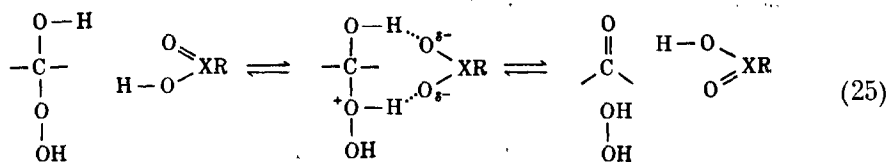
Протонирование уходящего атома кислорода необходимо для того, чтобы неподеленная электронная пара на другом атоме кислорода могла обеспечить достаточную движущую силу для вытеснения спирта. Однако, если уходящий атом кислорода становится более электрофильным в результате появления рядом электроноакцепторной карбонильной группы, он может быть вытеснен без кислотного катализа.



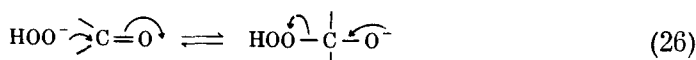
В лактоне VI неподеленная электронная пара эфирного атома кислорода обеспечивает достаточную движущую силу для самопроизвольного вытеснения карбоксилат-иона [38]. Совершенно аналогичная ситуация возникает при гидролизе анионов моноэфиров фосфорной кислоты. Гидролиз моноаниона, по-видимому, включает протонирование уходящего спирта и вытеснение его из диполярного промежуточного продукта VII, в то время как при гидролизе дианиона VIII происходит прямое вытеснение аниона кислорода и гидролиз становится значительным только с хорошей уходящей группой, типа карбоксилатной в ацилфосфатах [39]



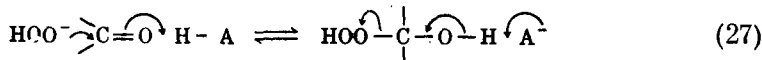
При образовании и распаде продукта присоединения перекиси водорода к карбонильной группе идет общекислотный и общешосновной катализ, и, вероятно, механизм этих процессов такой же, как и для аналогичных реакций воды [35]. Величины α и β для общекислотного и общешосновного катализа близки к 1,0 и 0,66 соответственно. Общекислотный катализ заметен по отрицательному отклонению каталитической константы для воды. Оба параметра α и β больше, чем соответствующие параметры для гидратации, вероятно, вследствие гораздо большей основности перекиси водорода по сравнению с водой. Ввиду больших скоростей отдельных процессов, требуемых для стадийного протекания реакции, и ввиду отрицательного отклонения каталитической константы для сольватированного протона можно предположить, что катализ карбоновыми кислотами и другими подобными соединениями может происходить через образование цикла, как это представлено схемой (25).



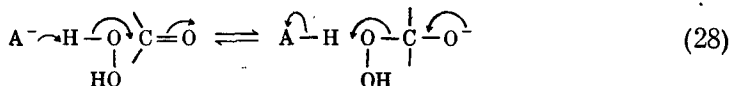
Кроме того, происходит некаталитическое присоединение и отщепление аниона гидроперекиси [схема (26)]



Эта реакция проявляется в положительном отклонении точки для катализа ионом гидроксила (т. е. в специфическом основном катализе). Если общешосновной катализ реакции идет по механизму (27), то наличие такой реакции



трудно объяснить, так как она должна выглядеть как катализируемая водой атака ($\text{H}-\text{A} = \text{H}_2\text{O}$) и должна попадать на тот же брэнстедовский график, что и с другими катализаторами. Это служит некоторым подтверждением механизма (28) (или соответствующего механизма «одного столкновения») для реакции, катализируемой общим основанием.

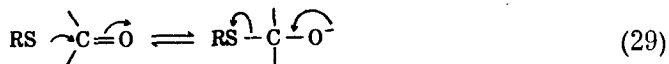


Высокое сродство перекиси водорода к карбонильной группе выражается также в низких энергиях переходных состояний: как свободная перекись водорода, так и ее анион атакуют карбонильную группу с необычайно высокой скоростью.

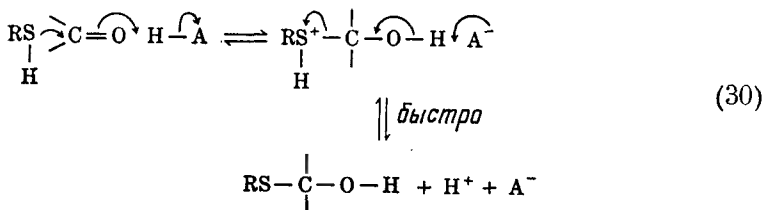
3. $\text{C}=\text{O}$ и RSH

Образование полугиацеталей происходит как путем прямого присоединения сильноосновного тиолового аниона к карбонильной группе [схема (29)], так и путем присоединения свободного тиола к карбонильной группе

под действием общекислотного катализатора {схема (30)} [40]. Отсутствует

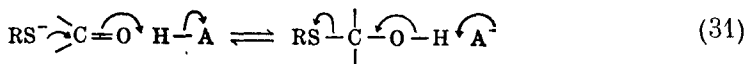


заметный водный или общеоосновной катализ присоединения слабокислотных тиолов, вероятно, из-за большой скорости присоединения аниона, маскирующего подобные механизмы. Корреляции между строением и реакционной



способностью свидетельствуют в пользу механизма (30) как кинетически значимого механизма общекислотного катализа, однако для этих реакций, как и для гидратации альдегидов, весьма вероятны согласованный механизм или механизм «одного столкновения».

При распаде полуацеталей более кислых тиолов, таких, как тиюксусная кислота и тиофенолы, идет общеоосновной катализ с $\beta = 0,8$; в обратном процессе присоединения аниона имеет место общекислотный катализ с $\alpha = 0,2$ {схема (31)} [41]. Кинетически эквивалентный механизм общеоосновного катализа атаки свободным тиолом исключен, так как такой катализ



обычно наблюдается в условиях, когда тиол на 98% находится в форме аниона. Наличие общеоосновного катализа при распаде этих аддуктов, вероятно, связано с легкостью вытеснения относительно хорошей уходящей группы; для более основных тиолов требуется полное удаление протона с гидроксильной группы ($\beta = 1,0$) с образованием алкоксидного иона, обладающего достаточной движущей силой для вытеснения уходящей группы. Наоборот, сильноосновные тиоловые анионы атакуют карбонильную группу самостоятельно ($\alpha = 0$), в то время как для слабоосновных анионов требуется общекислотный катализ. Скорость катализируемого гидроксильным ионом распада аддуктов слабоосновных тиолов очень велика и равна скорости процессов, лимитируемых диффузией.

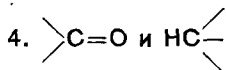
Как и в случае аддуктов перекиси водорода, высокая термодинамическая устойчивость полутиоацеталей коррелирует с высокой скоростью их образования. На высокую нуклеофильную реакционную способность свободного ионизированного тиолов указывает то, что скорость кислотного катализируемого присоединения тиозанола к ацетальдегиду примерно равна скорости присоединения воды, несмотря на приблизительно в 10^5 раз меньшую основность, а также на то, что анион меркаптоацетата присоединяется к ацетальдегиду быстрее, чем ион гидроксила, несмотря на то что его основность в 10^8 раз меньше [40].

Из значения констант скорости и равновесия присоединения воды и тиолов к ацетальдегиду можно вычислить и сравнить скорости распада полутиоацеталей и гидратов. Кислотно катализируемое отщепление тиола от полутиоацетала ацетальдегида и тиозанола происходит приблизительно в 2500 раз медленнее, чем кислотно катализируемая дегидратация гидрата

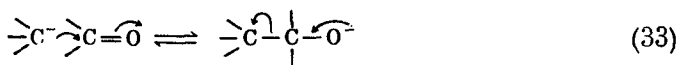
ацетальдегида. Также различаются константы равновесия образования этих двух соединений. Таким образом, вследствие низкой основности и высокого сродства к карбонильной группе тиоловая группа оказывается худшей уходящей группой в кислотно катализируемых реакциях, чем гидроксильная группа. Скорость основно катализируемого распада полутиацетала тиаэтанола и ацетальдегида в 2000 раз больше, чем скорость распада гидрата ацетальдегида, и описывается кинетическим уравнением:

$$v = k[\text{OH}^-] \left[\text{НОСХН} \right] \quad (32)$$

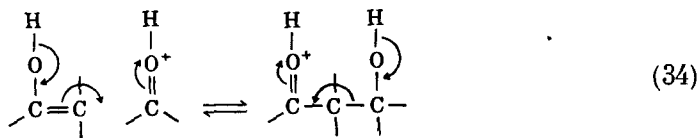
Интерпретация этого результата затрудняется из-за возможной разницы кислотностей полутиацетала и гидрата, однако, он указывает на то, что тиолатный анион является худшей уходящей группой, чем гидроксил. Это различие в легкости ухода соединений, содержащих серу или кислород, из промежуточного тетраэдрического продукта присоединения под действием основных или кислотных катализаторов может оказаться полезным при попытках предсказать скорость определяющую стадию в реакциях ацильной группы.



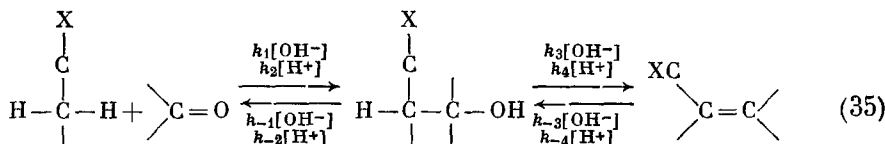
При присоединении к карбонильной группе цианид-иона — сильного нуклеофила — отсутствует заметный общий или специфический кислотный катализ {схема (33)} [42].



В условиях, когда скорость определяющей стадией, вероятнее всего, является присоединение к карбонильной группе, а не ионизация или енолизация соединения с реакционноспособным атомом углерода, общий кислотно-основной катализ присоединения вещества с реакционноспособным атомом углерода не был обнаружен ни в щелочной, ни в кислой среде [схема (34)], однако по этому вопросу необходимы дальнейшие исследования.



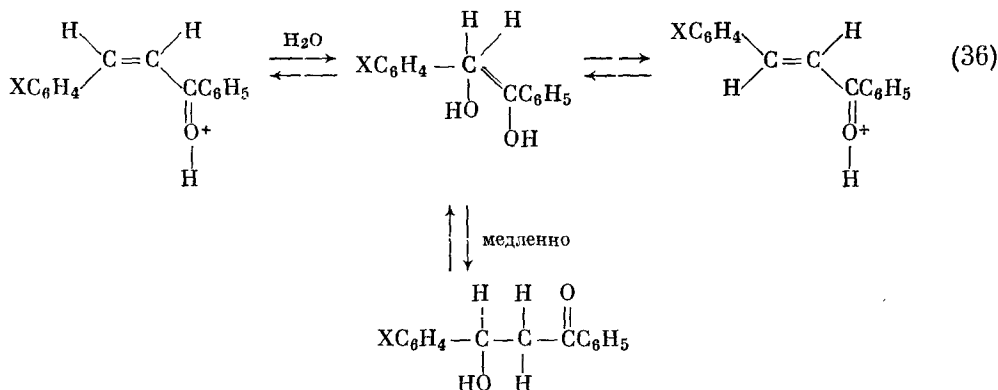
Относительная легкость присоединения и отщепления углерода в виде карбаниона в *основно* катализируемых реакциях обуславливает то обстоятельство, что в двухстадийной реакции присоединения карбонильного соединения с образованием ненасыщенного продукта [схема (35)] стадия дегидратации скорее лимитирует скорость реакции в щелочной, чем в кислой среде.



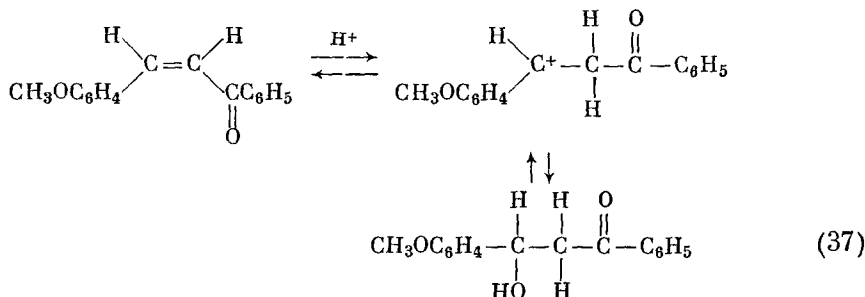
В промежуточных продуктах присоединения, образованных метилалкилкетонам и бензальдегидом, дегидратация и отщепление карбаниона происходят в щелочном растворе с одинаковыми скоростями. Это указывает, что

в любом направлении обе стадии реакции в определенной степени являются скоростью определяющими [43, 44]. Изменения в структуре реагентов влияют на отношения этих скоростей и, следовательно, могут изменять природу скорости определяющей стадии. В кислом растворе дегидратация промежуточного продукта происходит быстрее, чем отщепление углерода, следовательно, скорость определяющей стадией в любом направлении является присоединение и отщепление соединения с реакционноспособным атомом углерода [уравнение (35) k_2 , k_{-2}]. В этих условиях заместители в альдегиде слабо влияют на скорость, так как благоприятное воздействие электроноакцепторных заместителей на стадию конденсации уничтожается неблагоприятным влиянием на протонирование альдегида. Хорошо известно, что промежуточный продукт присоединения часто можно выделить из реакционной смеси альдольной конденсации, которую проводят в щелочной среде (т. е. скорость всей реакции определяется дегидратацией), в то время как в кислой среде дегидратация происходит быстро [45].

Процесс гидратация — дегидратация сам по себе является двухстадийной реакцией соединений, содержащих реакционноспособный атом углерода, так как перенос протона от атома и к атому углерода происходит медленно. Присоединение и отщепление воды идет быстрее, чем протонирование углерода в кислотно катализируемых реакциях бензальацетофенонов, которые претерпевают *цис-транс*-изомеризацию быстрее, чем происходит обмен водорода в α -положении к карбонильной группе {схема (36)} [44]

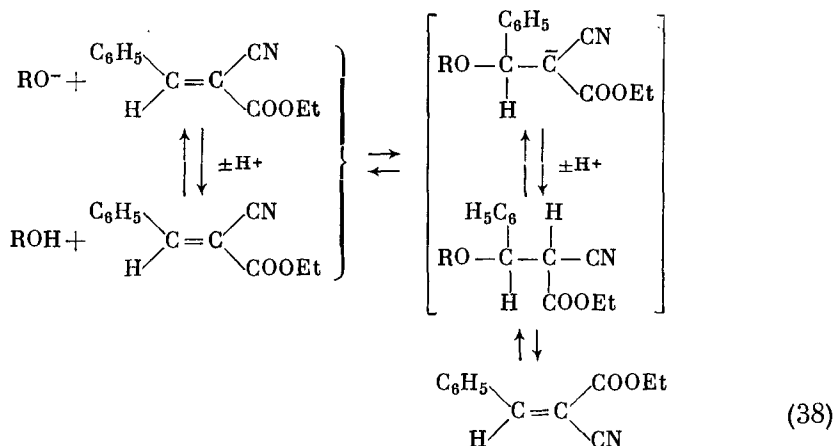


Для соединений, содержащих электронодонорные заместители, доминирующим становится механизм, включающий образование карбониевого иона {схема (37)} [46]

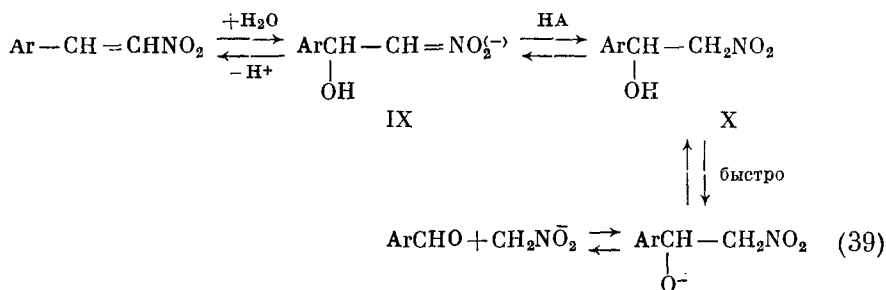


Присоединение спирта (и, по-видимому, отщепление спирта и воды в обратной реакции) к дибензилэтиленам и этил-*цис*- α -циано- β -*о*-метоксибензилакрилату [48] происходит по не зависящему от pH и специфическому основно

каталитическому механизмам. Реакция с последним соединением приводит к *цис-транс*-изомеризации, которая может осуществляться также под действием других нуклеофильных реагентов [схема (38)]



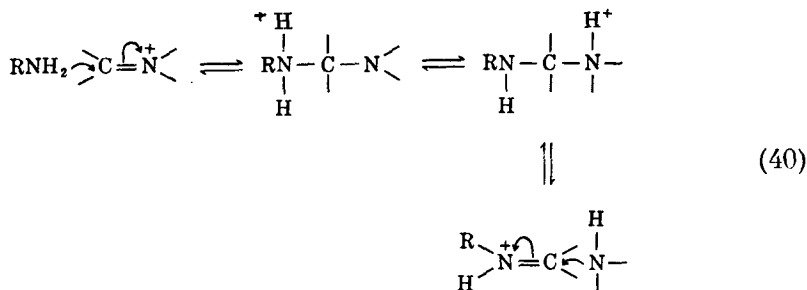
Механизм присоединения иона алкоголята очевиден, но механизм реакции с неионизированным спиртом не известен. При гидролизе нитростирола до бензальдегидов и нитроалканов промежуточное соединение, которое, по-видимому, является продуктом присоединения IX или X [схема (39)], образуется в быстрой стадии как в кислой, так и в щелочной среде, т. е. дегидратация



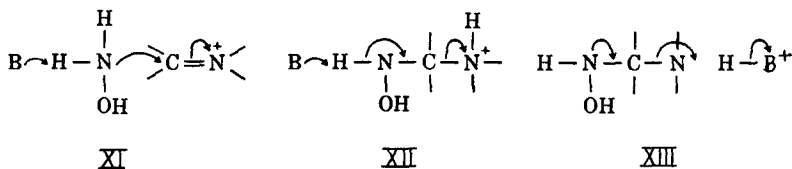
промежуточного соединения происходит, очевидно, быстрее, чем отщепление карбаниона или енола [49, 50]. При гидролизе стирила, образованного пипероналем и нитрометаном, происходит смена скорость определяющей стадии при изменении pH и при изменении концентрации буфера. Распад промежуточного продукта можно наблюдать непосредственно. Он может происходить как независимо от pH, так и катализироваться ионом гидроксила. Характер отдельных стадий в этой реакции точно не известен, но по аналогии с другими реакциями вполне вероятно, что катализируемая буфером стадия представляет собой протонирование карбаниона по механизму общекислотного катализа, что кинетически неотлично от реакции между нейтральными частицами, идущей по механизму общесосновного катализа. Возможность регенерации нитростирола, если промежуточный продукт присоединения, образованный в щелочном растворе, немедленно, но не после стояния обработать кислотой, указывает, что протонирование углерода идет медленнее по сравнению с присоединением и отщеплением иона гидроксила [49, 50], как и в случае кислотно катализируемых реакций бензальацетофенонов. При конденсации димедона с бензальдегидами также происходит смена скорость определяющей стадии при изменении pH, однако катализа буфером не наблюдается [51].

Б. >C=N- и RNH_2

Реакция аминов с имидами (переиминирование или «траншифизация») происходит преимущественно путем атаки на протонированный или катионный имин, как и в других случаях присоединения к этой группе {схема (40)} [17, 18, 52]

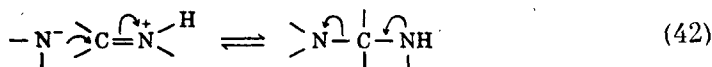
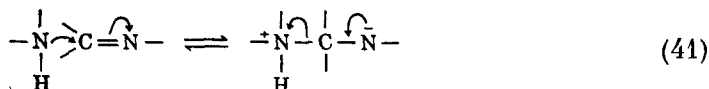


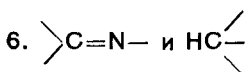
Если в качестве нуклеофила выступает гидроксилламин, а в качестве уходящей группы — диметиламин, в реакции катионного имида происходит общесосновной катализ второй молекулой гидроксилламина [18]. Этот катализ может осуществляться по механизмам XI, XII или XIII.



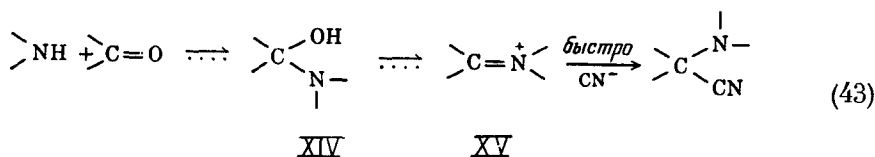
Так как в общем случае реакция симметрична, схемы XI и XIII представляют собой один и тот же механизм катализа для реакции в двух направлениях. В данной реакции механизм XIII маловероятен, так как основность свободного амина достаточна, чтобы промежуточный продукт протонировался без помощи катализатора при тех значениях pH, при которых проводились эксперименты. Образование самого неустойчивого промежуточного продукта — сопряженной кислоты оксима — можно избежать при катализе по механизму XII. Однако высказывалось предположение, что влияние строения реагентов на скорость реакции свидетельствует в пользу механизма, в котором скорость определяется атакой гидроксилламина [18].

Гидроксилламин реагирует также с бензгидриденметиламином при больших значениях pH, причем скорость реакции пропорциональна концентрациям реагентов в основной форме [18]. Чрезвычайная неустойчивость анионов амина, которые обязательно должны возникать как промежуточные соединения в некатализируемой реакции [схемы (41) и (42)], указывает на то, что в этой реакции либо имеет место общекислотный катализ, либо происходит согласованный внутримолекулярный перенос протона.

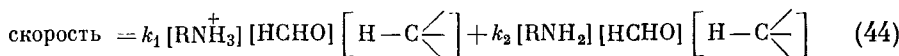




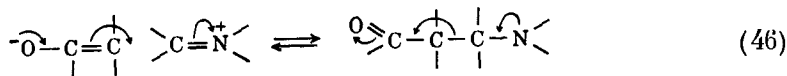
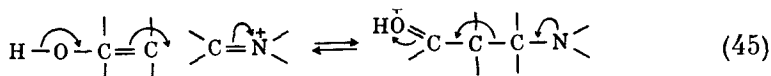
Механизм присоединения веществ с реакционноспособным атомом углерода к иминам, известный главным образом как вторая стадия реакции Манниха, твердо не установлен. Скорость присоединения цианида к аддукту, образованному ацетоном и вторичным амином, не зависит от концентрации цианида (или донора цианида). Это свидетельствует о том, что атака цианидом не является скоростью определяющей стадией и, следовательно, реакция должна идти через лимитирующее скорость образование катионного имина XV, а не через прямое замещение иона гидроксила цианидом в промежуточном соединении XIV [схема (43)] [53]. Интерпретация результатов кинети-



ческого исследования реакции Манниха [54, 55] затруднена неопределенностью относительно природы скорости определяющей стадии и ионного состояния реагирующих частиц в условиях кинетических экспериментов. Кинетическое уравнение для конденсации диметиламина, формальдегида и циклогексанона при значениях pH, когда амин находится в протонированной форме, содержит два слагаемых общего третьего порядка, один из которых отвечает реакции, не зависящей от pH, а другой — основно катализируемой реакцией [уравнение (44)] [55]. Это можно объяснить атакой катионного имина,



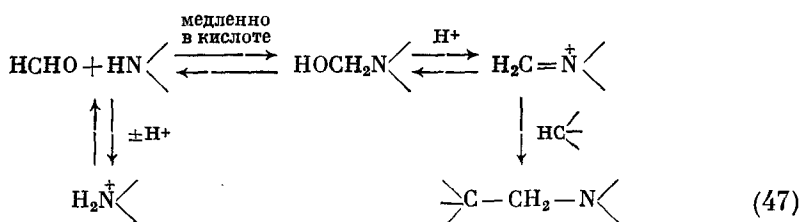
образованного из формальдегида и диметиламина, енолом или енолятом циклогексанона соответственно [схемы (45) и (46)].



По механизму, аналогичному механизму (46), вероятно, протекает стадия конденсации в реакции между ванилином и нитрометаном, катализируемой ацетатом аммония (гл. 3, разд. В,3).

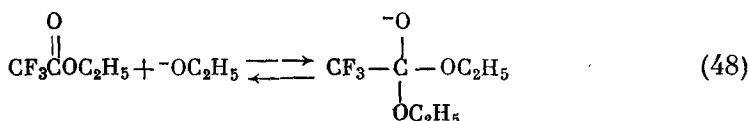
При добавлении оксиметильного или алкоксиметильного аддуктов пиперидина к кислому раствору антипирина образуются с хорошим выходом продукты конденсации Манниха в условиях, когда прямая реакция между пиперидином, формальдегидом и антипирином идет очень плохо [56]. Этот качественный результат служит убедительным доказательством того, что 1) последняя стадия конденсации идет через катионный имин, образованный элиминированием из аддукта пиперидина, и 2) скорость определяющей стадией всей реакции в этих условиях является реакция свободного пиперидина с формальдегидом [схема (47)]. Уничтожение индукционного периода в реакции конденсации этилмалоновой кислоты, формальдегида и диметиламина путем предварительной инкубации формальдегида и диметиламина указывает

на то, что реакция амина с формальдегидом может быть скоростью определяющей стадией всей реакции также и в кислой среде [54].

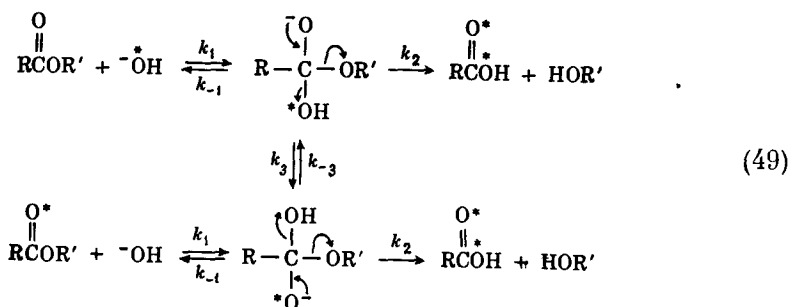


7. RCOR' и HOR''

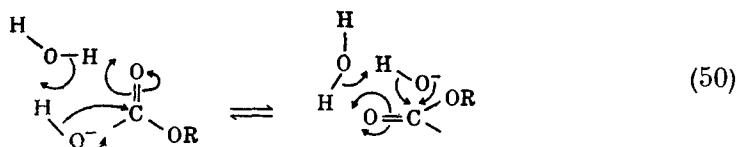
При гидролизе и алкоголизе сложных эфиров и ангидридов наблюдаются кислотный катализ, основной катализ, а также механизм, не зависящий от изменений pH. Среди этих путей протекания реакции наиболее доступен для понимания основно каталитический из-за его симметрии и относительно небольшого числа возможных механизмов катализа переноса протона. Тетраэдрический промежуточный продукт присоединения можно наблюдать непосредственно при добавлении этилат-иона к этиловому эфиру трифторуксусной кислоты в неполярном растворителе в условиях, когда собственно реакция переноса ацильной группы невозможна {схема (48)} [3].



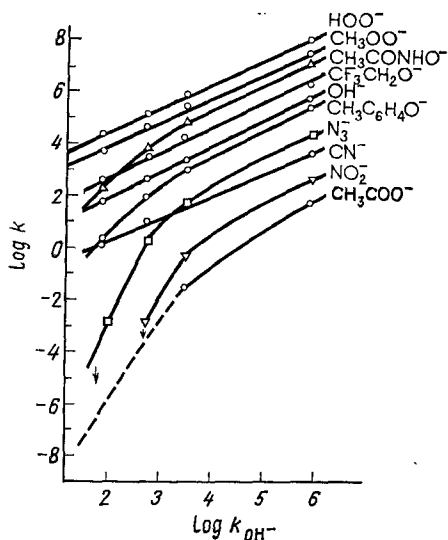
При щелочном гидролизе сложных эфиров с относительно плохими уходящими группами обмен карбонильного атома кислорода с меченым атомом кислорода растворителя, который, вероятно, идет через тетраэдрический промежуточный продукт присоединения, наблюдается в небольшой степени {схема (49)} [57], но может предположительно идти по согласованному меха-



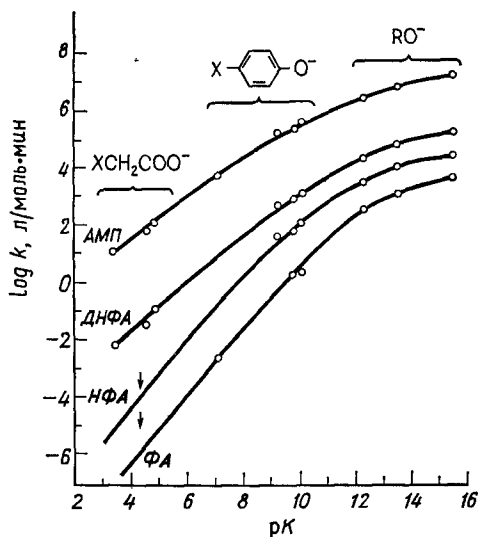
низму, если в процессе реакции могут осуществляться отдельные переносы протона за времена, малые по сравнению с временем жизни промежуточного продукта, которым он должен обладать, чтобы заслуживать название «промежуточный продукт» {т. е. по схеме (50)} [58].



анионов со сложными эфирами, имеющими хорошие уходящие группы, такими, как замещенные фениловые эфиры, константы скорости для ряда эфиров прямо пропорциональны константам скорости для реакций этих эфиров с ионом гидроксидов (рис. 14, верхние прямые). Константы скорости возрастают с ростом pK нуклеофила и падением pK уходящей группы по брэнстедовской зависимости с наклоном около 0,3 [60]. Для этих реакций переходное



Р и с. 14. Корреляция скоростей реакций анионных нуклеофилов с замещенными фенилацетатами и 1-ацетокси-4-метоксипиридином. Показан излом на корреляции между строением и реакционной способностью, когда атакующая группа становится менее основной, чем уходящая [60].



Р и с. 15. Зависимость скорости реакции анионных кислородсодержащих нуклеофилов с замещенными фенилацетатами и 1-ацетокси-4-метоксипиридином (АМП) от основности нуклеофила [60].

состояние достигается быстро по координате реакции. При переходе к худшим уходящим группам или более слабым нуклеофилам на корреляции между строением и реакционной способностью появляется кривизна, и скорость начинает более резко зависеть от основности нуклеофила и уходящей группы. В конце концов, как и в реакциях имидазола со сложными эфирами, нуклеофил совершенно перестает прямо вытеснять уходящую группу, а скорее выступает в качестве общесосновного катализатора гидролиза эфира. Для кислородсодержащих нуклеофилов этот переход происходит на реакции ацетата (pK 4,7) с p -нитрофениловым эфиром уксусной кислоты (pK уходящей группы 7,0); эта реакция осуществляется частично путем нуклеофильной атаки, частично по механизму общесосновного катализа [61]. Более сильная зависимость от pK уходящей группы проявляется в отрицательном отклонении нижних линий рис. 14. Логарифмические зависимости скоростей нуклеофильных реакций от pK нуклеофила также искривлены книзу, как показано на рис. 15, где стрелки соответствуют скоростям гидролиза при общесосновном катализе и, следовательно, отмечают верхнюю границу для скоростей нуклеофильных реакций. При плохих уходящих группах и слабых нуклеофилах величина $\beta \sim 1,0$ как для атакующей, так и для уходящей групп. Это значит, что переходное состояние достигается далеко по координате реакции в случае, когда атакующая группа менее основна, чем уходящая, а также указывает на то, что, по-видимому, скорость реакции определяется разложением тетраэдрического промежуточного продукта присоединения.

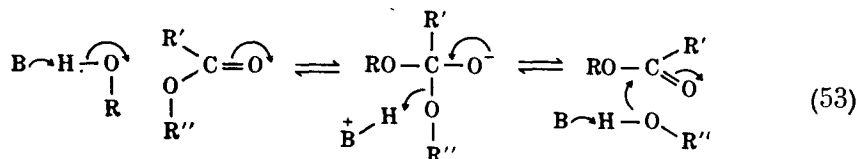
Очевидно, происходит смена скорость определяющей стадии при изменении природы атакующей и уходящей групп, однако на основании этих результатов нельзя точно установить, осуществляется ли здесь скачкообразный переход от скорость определяющего образования к скорость определяющему распаду промежуточного продукта или имеет место непрерывное изменение согласованного механизма реакции, в которой нет промежуточного продукта (рис. 12).

При реакциях сложных эфиров и ангидридов с нейтральными кислородсодержащими нуклеофилами, такими, как вода или спирты, имеет место общесредовой катализ [62, 63]. Тот факт, что константы скорости реакции с водой попадают на тот же брэнстедовский график с наклоном 0,47, что и константы скорости для других общесредовых катализаторов, служит указанием на то, что в реакции с водой вода выступает как общесредовой катализатор атаки водой. Однако константа скорости щелочного гидролиза отклоняется в положительную сторону от этой брэнстедовской зависимости. Это указывает на то, что рассматриваемая реакция идет по другому механизму, а именно путем прямой нуклеофильной атаки ионом гидроксидов [63]. Константы скорости второго порядка реакций с водой в 10^7 — 10^{11} раз меньше констант скорости щелочного гидролиза и более чувствительны к структуре эфира. Зависимость $\log k_{H_2O}$ от $\log k_{OH^-}$ имеет наклон 2,1 для ряда сложных эфиров с переменной уходящей группой и наклон 1,4 для ряда эфиров с переменной ацильной группой [12].

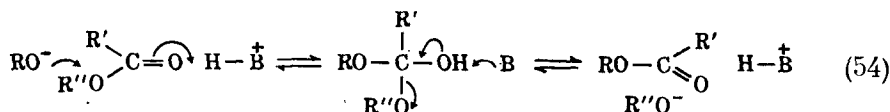
Реакции сложных эфиров и ангидридов с водой обладают рядом характерных свойств. Энтропии и объемы активации имеют необычайно большие отрицательные значения в пределах от -20 до -50 энтр. ед. (от -84 до -210 Дж/моль·К) и от -19 до -22 мл/моль соответственно [63, 64]. Эти величины, вероятно, обусловлены тем, что в переходном состоянии большое число молекул растворителя иммобилизовано и подвергнуто электрострикции, что связано с сольватацией образующихся зарядов и переносом протонов (который может происходить, поскольку на это указывает наблюдающийся общесредовой катализ). Дейтериевый изотопный эффект растворителя k_{H_2O}/k_{D_2O} обычно находится в пределах 2,0...4,0 [63, 65, 66]. Такие реакции, а также гидролиз ацетиламидазолиевого катиона сильно тормозятся в концентрированных растворах определенных солей и (если отсутствует кислотный катализ) кислот [63, 67, 68]. Поразительным примером служит 500-кратное уменьшение скорости гидролиза ацетилимидазолия в присутствии 8 моль/л перхлората натрия [67]. Это ингибирование нельзя полностью объяснить уменьшением активности воды в концентрированных растворах солей, и, вероятно, в нем проявляется взаимодействие солей с полярными карбонильными соединениями, обладающее особой чувствительностью к природе аниона соли.

Проблема механизма общесредового катализа при алкоголизе и гидролизе сложных эфиров упрощается, но не разрешается симметрией реакции. Если атакующая и уходящая группы обладают одинаковыми свойствами, обратная реакция представляет собой просто зеркальное отражение прямой и, согласно принципу микроскопической обратимости, должна иметь тот же механизм катализа. Симметричность реакции подтверждается тем обстоятельством, что отношение k_{hydr}/k_{exch} равно 2 для нейтрального гидролиза этилового эфира трифторуксусной кислоты [69], что означает, что отщепление этанола идет с той же скоростью, что и перенос протона и отщепление воды, которые необходимы для осуществления реакции обмена. Простейший механизм с образованием тетраэдрического промежуточного продукта присоединения содержит более или менее согласованное удаление протона молекулой общего основания с гидроксилсодержащего соединения при атаке им карбонильной группы. При этом слабонуклеофильная гидроксильная группа превращается в некоторого рода частичный или потенциальный ион алкоголята или гидроксидов [схема (53)]. Это такой же простейший механизм, как и при

присоединении гидроксилсодержащего соединения к простому карбонильному соединению. Модификацией этого механизма может быть механизм «одного столкновения», в котором сопряженная кислота катализатора временно подает протон на карбонильную группу, когда она приобретает отрицательный заряд, однако отсутствие особой каталитической активности у полифункциональных катализаторов, таких, как фосфат, указывает на отсутствие истинного согласованного кислотно-основного катализа. Альтернативный



механизм, в котором ион алкоголята, образующийся в предварительной равновесной стадии, атакует карбонильную группу при помощи обще-кислотного катализатора [схема (54)], для катализируемого пиридином

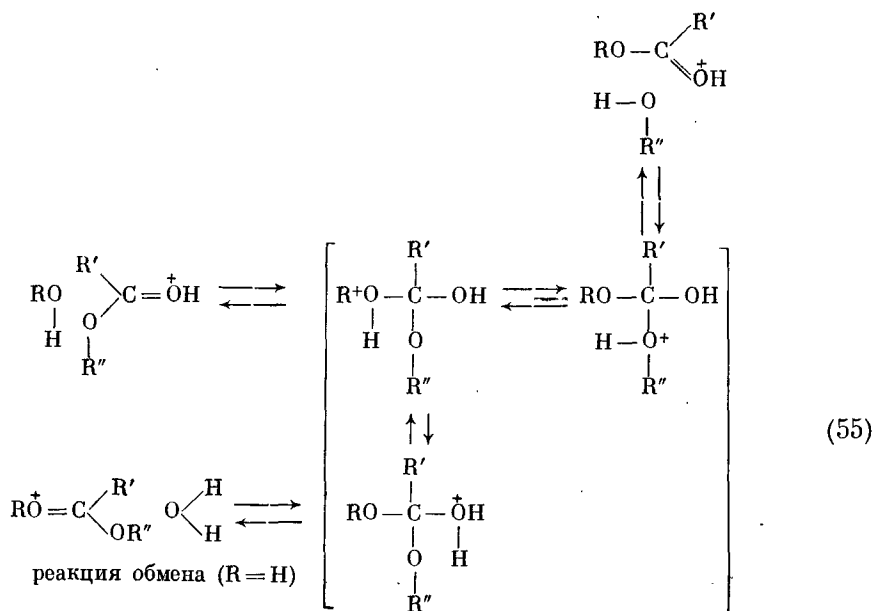


алкоголиза этилового эфира трифторуксусной кислоты маловероятен, так как при его осуществлении, чтобы объяснить наблюдаемую скорость реакции, требуется константа скорости атаки ионом алкоголята образованного водородной связью комплекса сложного эфира с катализатором, большая чем $7,4 \cdot 10^9$ л/моль · с. Если принять справедливость этого вывода, аргументы, основанные на симметрии реакции, указывают, что должен образовываться промежуточный продукт присоединения. Механизм (54) маловероятен, и, если отсутствует промежуточный продукт, симметрия реакции требует, чтобы каталитическим было как присоединение, так и отщепление спирта; последнее должно было бы привести к появлению в кинетическом уравнении члена второго порядка по концентрации катализатора для согласованной реакции [66, 70].

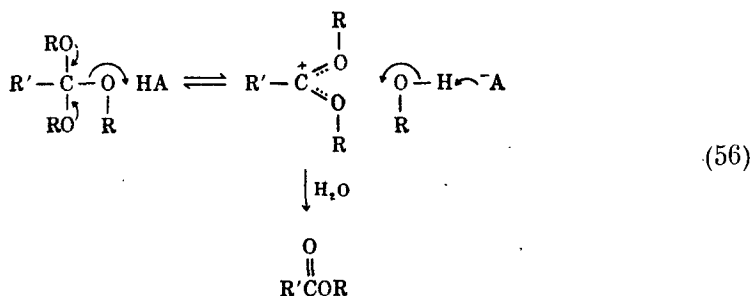
Степень обмена кислородом при независимом от pH гидролизе этилового эфира трифторуксусной кислоты понижается в два-три раза в растворе окиси дейтерия [69]. Это можно объяснить уменьшением скорости распада промежуточного продукта на исходные вещества по сравнению со скоростью распада на конечные продукты реакции в окиси дейтерия (известно, что скорость образования промежуточного продукта уменьшается в окиси дейтерия) или уменьшением скорости переноса протона, который необходим, чтобы мог произойти обмен кислорода, или обоими этими факторами.

Очень мало известно о механизме кислотно катализируемого гидролиза и алкоголиза сложных эфиров. Обмен меченого кислорода с растворителем происходит в этих реакциях со скоростью, приблизительно в три раза меньшей, чем гидролиз. Это свидетельствует о том, что здесь, вероятно, образуется промежуточный продукт присоединения с временем жизни, достаточным, чтобы произошел перенос протона, необходимый для осуществления обмена {схема (55)} [71]. Из очень небольшой основности сложных эфиров (pK сопряженной кислоты этилбензоата равно $-7,4$ [72]) следует, что сопряженная кислота сложного эфира является чрезвычайно нестабильным промежуточным продуктом. Отсюда также следует, что механизм обще-кислотного катализа, который позволяет избежать образования такого промежуточного

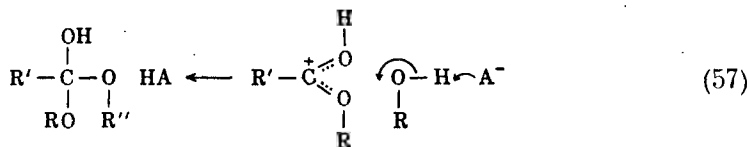
продукта, должен быть энергетически выгодным. При гидролизе ортоэфиров



имеет место общекислотный катализ [73], который должен осуществляться по механизму (56).



При обратной реакции идет общеосновной катализ атаки спиртом (или водой) *o*-алкилированного эфира, который является модельным соединением для протонированного сложного эфира [схема (57)]. Это приводит к обоснованному механизму общекислотного катализа гидролиза или алкохолиза сложных

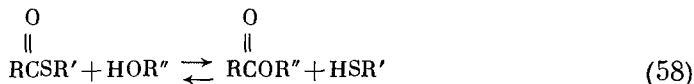


эфиров и указывает на то, что этот тип катализа может иметь место. Однако в случае реакций сложных эфиров должна также рассматриваться возможность существования согласованного механизма или механизма «одного столкновения», в котором кислотный катализатор подает протон на карбонильную группу сложного эфира. Существуют доказательства общекислотного катализа при этерификации кислот в спиртовом растворе [74].

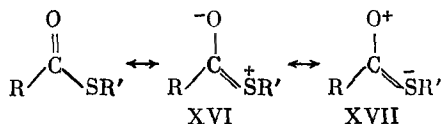
Для соединений с лучшей уходящей группой отношение скорости обмена ^{18}O с растворителем к скорости гидролиза в основном катализируемых реакциях уменьшается, так как в промежуточном продукте присоединения всегда будет скорее происходить вытеснение хорошей уходящей группы и гидролиз, чем вытеснение иона гидроксила и обмен. Так, при щелочном гидролизе фенолбензоата обмен не наблюдается [75]. Однако в кислотно катализируемых реакциях необходимо протонирование уходящей группы, и неблагоприятное влияние на это протонирование электроноакцепторных заместителей должно препятствовать вытеснению спирта. Таким образом, если перенос протона в промежуточном продукте идет быстро, отношение скоростей обмена и гидролиза должно оставаться постоянным или даже возрастать в кислотно катализируемых реакциях при введении в уходящую группу электроноакцепторных заместителей.



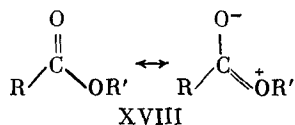
Равновесие переноса ацильной группы между тиоловой и гидроксильной группами [схема (58)] смещено в сторону переноса на OH-группу примерно



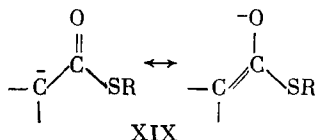
в 50 раз [76]. Это, по-видимому, вызвано главным образом относительно слабой стабилизацией тиоэфиров резонансом между формами XVI и XVII



по сравнению со стабилизацией кислородных эфиров за счет резонансной формы XVIII. Электронам большого атома серы трудно эффективно перекрываться с электронами примыкающей карбонильной группы для образования двойной связи (XVI). Однако сера может принимать электроны на

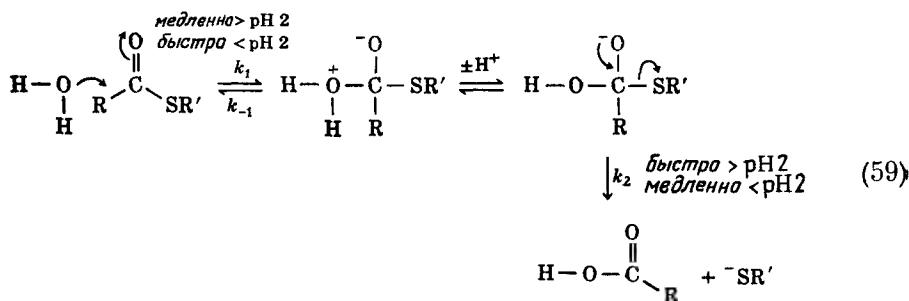


незаполненные *d*-орбитали (XVII), тогда как кислород не может этого осуществить, и низкая валентная частота карбонильной группы, а также слабая основность тиоэфиров подтверждают, что структура XVII вносит значительный вклад в основное состояние тиоэфиров [77]. Из-за небольшого вклада структуры XVI карбонильная группа тиоэфиров остается относительно мало искаженной, так что они обладают многими свойствами простых кетонов. Хорошо известную легкость образования карбанионов, примыкающих к тиоэфирной группе в химических и ферментативных реакциях, можно в связи с этим объяснить резонансной стабилизацией.

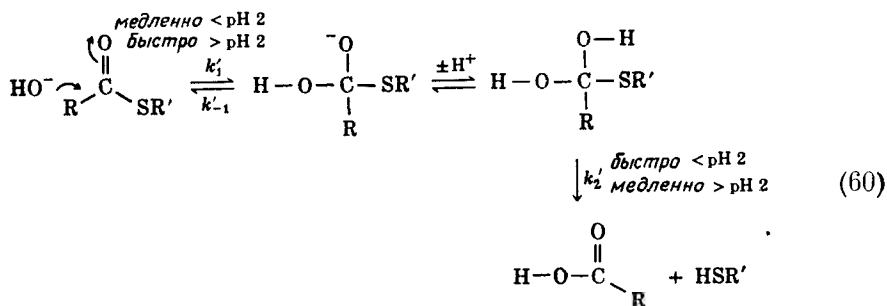


Важные характерные черты механизма гидролиза тиоэфиров были выяснены посредством комбинации экспериментов по обмену кислорода и кине-

тических экспериментов. рН-Зависимость скорости гидролиза этилового эфира трифтортиоуксусной кислоты имеет сигмоидную форму (рис. 16), причем *уменьшение* скорости при значениях $\text{pH} < 2$ должно соответствовать переходу от скорости определяющей стадии с незаряженным переходным состоянием при нейтральных значениях рН к скорости определяющей стадии с анионным переходным состоянием при значениях $\text{pH} < 2$ [78]. Кроме того, наблюдается *увеличение* скорости при высоких значениях рН. Это свидетельствует, что скорость определяющая стадия реакции при нейтральных значениях рН может идти как через анионное, так и через нейтральное переходные состояния. Нейтральное переходное состояние реакции, не зависящей от рН, может соответствовать атаке тиоэфира водой [схема (59), k_1] или кинетически экви-



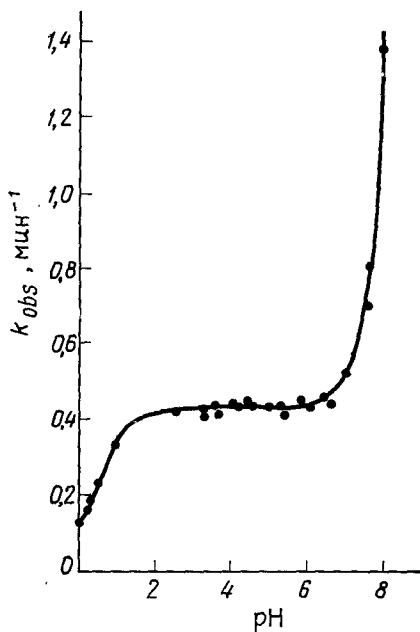
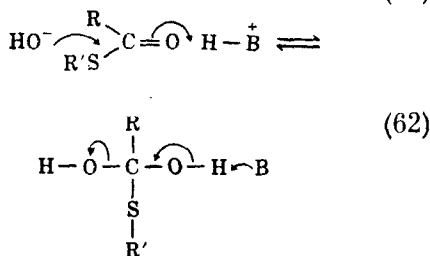
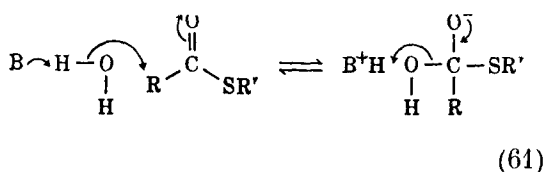
валентному распаду тетраэдрического промежуточного продукта через незаряженное переходное состояние [схема (60), k'_2]. В первом случае стадией, ингибируемой кислотой при низких значениях рН, был бы основно катализируемый распад тетраэдрического промежуточного продукта [схема (59), k_2], в то время как во втором случае это была бы атака эфира ионом гидроксила [схема (60), k'_1]. Механизмы (59) и (60) приводят к одинаковым кинетическим



уравнениям, как и следовало ожидать, исходя из одинакового стехиометрического состава переходных состояний в этих механизмах. Поэтому их нельзя различить, используя лишь одни кинетические данные. Однако механизм (60) с большой вероятностью исключается потому, что наблюдаемая скорость реакции при низких значениях рН (где скорость реакции должна определяться атакой ионом гидроксила) возможна только в случае, когда константа скорости k'_1 имеет величину $2,5 \cdot 10^{11}$ л/моль·сек, что превышает значение константы скорости реакции, лимитируемой диффузией. Справедливость механизма (59) подтверждается тем, что при значениях $\text{pH} < 2$, когда скорость определяется распадом промежуточного продукта, в эфире происходит обмен ^{18}O с растворителем, в то же время при значениях $\text{pH} > 2$, когда скорость отщепления тиолатного аниона велика, кислородный обмен не наблюдается [69].

Более того, можно уточнить в некоторых деталях механизмы отдельных стадий этой реакции, и тогда они оказываются такими же, как и для соответ-

ствующих стадий в реакциях простых карбонильных соединений. При атаке тиоэфира водой происходит общесредовой катализ, причем константа скорости реакции с водой соответствует той же брэнстедовской зависимости, которая выполняется для других общесредовых катализаторов. Это указывает, что при реакции с водой идет основной катализ водой, как и при гидролизе кислородных эфиров [78]. Такой катализ может заключаться в удалении протона от атакующей молекулы воды [схема (61)] для предотвращения образования неустойчивого иона оксония в качестве предварительного продукта в реакции присоединения или в общеосновном катализе присоединения иона гидроксидила [схема (62)], чтобы избежать образования иона алкоксида в продукте присоединения.



Р и с. 16. pH-зависимость скорости гидролиза этилтрифтороацетата в воде при 30°C [78].

В соответствии с последним механизмом в реакции с водой идет катализ ионом гидроксония атаки иона гидроксидила, при этом необходима константа скорости $6,6 \cdot 10^{11} \text{ л}^2/\text{моль}^2 \cdot \text{с}$, что является достаточно большой величиной, чтобы практически исключить этот механизм. Таким образом, механизмом стадии гидратации является, по-видимому, механизм (61) (или соответствующий согласованный механизм, или механизм «одного столкновения»), как и для общеосновного катализа гидратации карбонильных соединений.

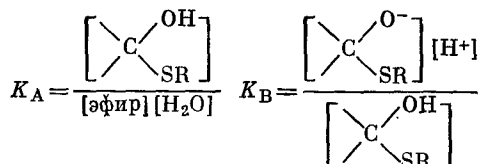
Отщепление тиолатного аниона при распаде промежуточного продукта присоединения по уравнению (59) представляет собой простую основно катализируемую реакцию, соответствующую обращению некаталитического присоединения тиолатного иона к простым карбонильным соединениям. Присоединение тиоловых групп при низких значениях pH идет по механизму общеосновного катализа. Это указывает, что такой механизм может стать существенным для распада тетраэдрического промежуточного продукта при низких значениях pH. Наблюдаемые константы скорости гидролиза этилового эфира трифтороуксусной кислоты в 2 и 6 моль/л соляной кислоте, равные 0,076 и 0,043 мин⁻¹ соответственно [78], в 2,6 и 37 раз больше, чем следует из кинетического уравнения для гидролиза в разбавленной и в концентрированной кислоте (с использованием функции H_0) [79]. Это подтверждает, что распад промежуточного продукта может также происходить по кислотно каталитическому или не зависящему от pH механизмам.

Скорость распада анионного промежуточного продукта в уравнении (59) должна быть чрезвычайно большой. Константа скорости этой реакции опре-

деляется уравнением

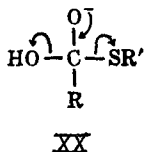
$$k_2 = \frac{k_{\text{obs}} (k_2/k_{-1} + [\text{H}^+])}{K_A K_B} = \frac{2,5 \cdot 10^{-3}}{K_A K_B}, \quad (63)$$

где K_A — константа равновесия образования продукта присоединения, а K_B — константа ионизации промежуточного продукта. Так как в литературе нет сведений о каких-либо доказательствах накопления продукта присоединения, константа K_A , вероятно меньше чем 0,1. Если принять $K_B = 10^{-10}$, то k_2 оказывается больше, чем $2,5 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$; меньшие значения K_A



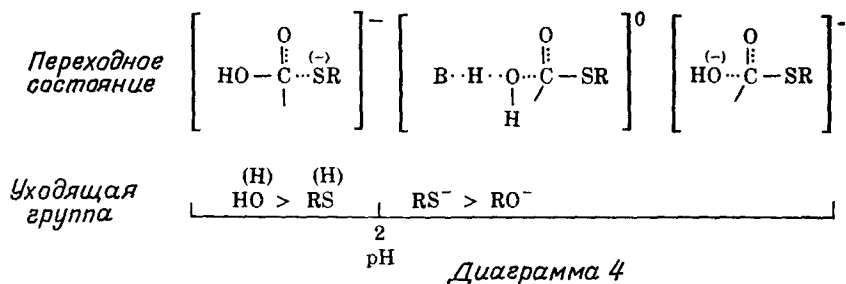
и K_B будут давать еще большую цифру. Если k_2 так велика для промежуточного продукта присоединения, образованного эфиром с сильно электроноакцепторной ацильной группой и относительно основным тиолатным анионом в качестве уходящей группы, то промежуточные продукты, образованные другими тиоэфирами, будут еще менее устойчивыми и будут распадаться еще быстрее. Так как константа скорости распада промежуточного продукта в реакции этилового эфира трифтортиоуксусной кислоты уже близка к пределу, определяемому диффузией разделяющихся продуктов реакции, скорость определяющей стадией в этих реакциях будет скорее перенос протона или диффузия, чем стадия, на которой образуются или разрушаются связи с углеродом. Диффузионный процесс удаления протона ионом гидроксила является скоростью определяющей стадией в распаде полутиацеталей — реакцией, которая аналогична распаду продукта присоединения при гидролизе тиоэфиров [41].

Характер скорость определяющей стадии при значениях $\text{pH} < 2$ указывает, что протонирование и отщепление гидроксильной группы от промежуточного продукта присоединения происходит легче, чем протонирование и отщепление тиоловой группы. Это согласуется с относительными скоростями кислотно катализируемого распада полутиацеталей и гидратов альдегидов. Смена скорость определяющей стадии происходит потому, что при значениях $\text{pH} > 2$ промежуточный продукт распадается по быстрой основно катализируемой реакции, в которой вытеснение тиолат-иона идет легче, чем иона гидроксила (XX).



Это также находится в соответствии с поведением простых карбонильных продуктов присоединения. К тому же выводу относительно предпочтительного способа распада промежуточного продукта присоединения можно прийти на основании константы равновесия и некоторых вычисленных констант скоростей для отдельных стадий основно катализируемой реакции $\text{S} \rightarrow \text{O}$ переноса в S-ацетилмеркаптоэтаноле [80]. Предпочтительные типы распада про-

межуточного продукта в гидролизе тиоэфиров сведены в диаграмму



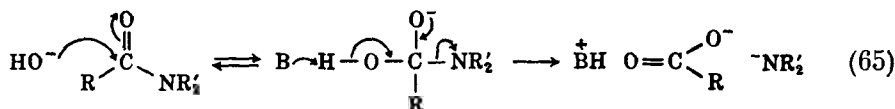
Следует обратить внимание на то, что отщепление тиолат-аниона предпочтительнее отщепления гидроксильной группы по любому механизму при всех значениях $\text{pH} > 2,0$.



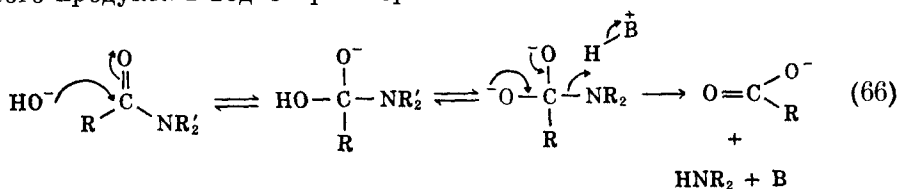
Наиболее полно исследованной реакцией амидов является щелочной гидролиз анилидов. Кинетическое уравнение этой реакции содержит член второго порядка по концентрации ионов гидроксила [81]. Так как маловероятно, чтобы атака ионом гидроксила могла катализироваться вторым ионом гидроксила [схема (64)], этот член должен соответствовать скорости определяющему основно катализируемому отщеплению анилина от анионного тетраэдрического промежуточного продукта присоединения.



Один из возможных механизмов этого процесса показан схемой (65).



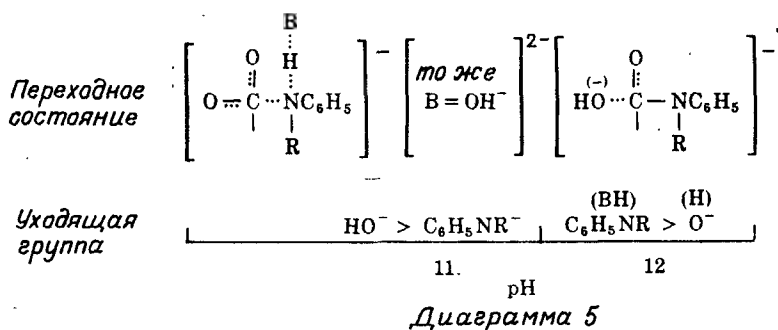
Гидролиз диацетиламин (азотсодержащих аналогов ангидридов) также описывается кинетическим уравнением, содержащим член второго порядка по концентрации ионов гидроксила, что можно интерпретировать таким же образом [82]. Сообщалось, что при гидролизе анилидов возможен общесосновной катализ [83—85]. Это указывает, что член в кинетическом уравнении, имеющий второй порядок по концентрации ионов гидроксила, может быть также обусловлен общесосновным катализом. Общесосновной катализ может идти по механизму (65) или по кинетически эквивалентному механизму (66). Последний механизм более вероятен, так как он позволяет избежать образования аниона анилина ($\text{pK}_a \sim 27$) [86], который настолько неустойчив, что почти несомненно не может существовать в виде самостоятельного промежуточного продукта в водном растворе.



Эта реакция — одна из немногих, в которых обмен ^{18}O с растворителем идет быстрее, чем гидролиз [87], что должно иметь место, если распад промежуточного тетраэдрического продукта присоединения на конечные продукты реакции является скоростью определяющей стадией. Этот механизм подтверждается далее кинетическим доказательством смены скорости определяющей стадии при возрастании концентрации ионов гидроксидла [83—85]. При увеличении концентрации ионов гидроксидла вторая стадия, имеющая второй порядок по концентрации OH^- , становится настолько быстрой, что первая стадия — атака одним ионом гидроксидла — становится скоростью определяющей и наблюдаемая скорость реакции приобретает первый порядок по концентрации ионов гидроксидла.

Гидролиз идет также по реакции, имеющей первый порядок по концентрации ионов гидроксидла в условиях, когда скорость главным образом определяется распадом промежуточного продукта. Согласно механизмам (65) и (66), этот кинетический член соответствует «водной реакции», в которой вода выступает в качестве основания, удаляющего протон с кислорода в тетраэдрическом промежуточном продукте [схема (65)], или реакции иона гидроксония, который подает протон на уходящий анион анилина [схема (66)]. Влияние заместителей в анилине на скорость реакции свидетельствует в пользу второго механизма. Скорость всей реакции почти не чувствительна к заместителям в анилиновой группе ($\rho = 0,1$), как можно было бы предполагать в случае, если благоприятное влияние электронодонорных заместителей на протонирование атома азота уничтожается неблагоприятным влиянием этих заместителей на равновесную концентрацию промежуточного продукта присоединения и легкость ухода анилина [87]. Важность подачи электронов подтверждается далее тем, что электронодонорные заместители в анилине вызывают увеличение отношения скоростей гидролиза и обмена кислорода ($\rho = -1$), облегчая протонирование анилина и ускоряя его отщепление от промежуточного продукта присоединения по сравнению с отщеплением иона гидроксидла. При этом почти достигается точка, в которой должна произойти смена скорости определяющей стадии при вариации заместителя. При высоких концентрациях ионов гидроксидла скорость отщепления анилина по механизму, бимолекулярному относительно ионов гидроксидла, становится большой, так что отношение скоростей гидролиза и обмена возрастает [87].

Предпочтительные типы распада тетраэдрического промежуточного продукта сведены в диаграмму



Отношение скоростей обмена ^{18}O и гидролиза понижается с ростом концентрации ионов гидроксидла также при гидролизе бензамида. В N-метилбензамиде обмен происходит в меньшей степени, чем в бензамиде, а в N,N-диметилбензамиде обмен не наблюдается совсем [88]. Одно из возможных объяснений этого заключается в том, что при введении заместителей у атома азота группам в тетраэдрическом промежуточном продукте становится тесно, и в результате этого тенденция к вытеснению амина (при этом не происходит

обмена) увеличивается в большей степени, чем иона гидроксила (вытеснение которого приводит к обмену). Интересно, что отношение скоростей обмена и гидролиза *увеличивается* примерно в два раза в растворе окиси дейтерия по сравнению с водным раствором, несмотря на то что для осуществления обмена необходим перенос протона. Это может быть следствием более медленного протонирования и отщепления амина в растворе окиси дейтерия [схема (66)]. В целом скорость гидролиза бензамида (для которого скорость определяется главным образом стадией отщепления амина) уменьшается в окиси дейтерия, в то время как гидролиз диметилбензамида, в котором не происходит обмена, в окиси дейтерия несколько ускоряется [88].

Аминолиз сложных эфиров представляет собой более сложную проблему [схема (1)], однако она может быть решена по крайней мере в основных чертах: 1) путем использования кинетических доказательств смены скорости определяющей стадии, что позволяет установить существование промежуточного продукта и заряда переходного состояния в различных областях pH, и 2) идентификацией скорости определяющей стадии путем создания промежуточного продукта из соответствующего имидата и установления предпочтительного типа его распада на конечные продукты при различных значениях pH. Так, из влияния pH и катализаторов на соотношение скоростей распада промежуточного тетраэдрического продукта, образующегося при гидролизе N-фенилиминолактона, на различные возможные конечные продукты можно заключить, что, если тот же промежуточный продукт образуется при аминолизе лактона анилином, скорость определяющей стадией аминолиза при значениях $\text{pH} < 7$ будет отщепление алкоксидного аниона [схема (13), рис. 13]. При высоких значениях pH скорость определяющей стадией является атака лактона анилином, в которой идет согласованный общий кислотно-основной катализ. Эту реакцию аминолиза непосредственно не изучали, но была исследована обратная реакция — внутримолекулярный алкоголиз анилида [схема (13), справа налево] и обнаружена смена скорость определяющей стадии при изменении концентрации катализатора, что и предсказывалось на основании влияния катализаторов на состав конечных продуктов гидролиза имидата [89].

pH-Зависимость скорости внутримолекулярного аминолиза аминоксигматического эфира указывает на смену скорость определяющей стадии вблизи pH 8 и, следовательно, на существование в этой реакции промежуточного продукта [90]. Изменения скорость определяющих стадий в реакциях метилформиата с рядом аминов указывают на существование промежуточных продуктов также и в этих межмолекулярных реакциях. Природу скорость определяющей стадии можно установить на основании характера конечных продуктов гидролиза имидата XXI при различных значениях pH [91]. Полностью механизм этих реакций показан на схеме (67), а pH-зависимость скорости реакции метилформиата с гидразином, которая служит иллюстрацией основных путей реакции, показана на рис. 17.

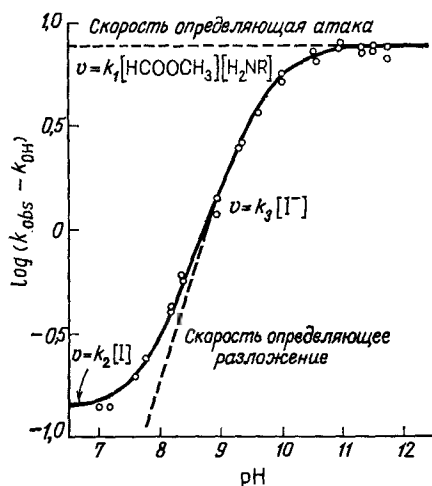
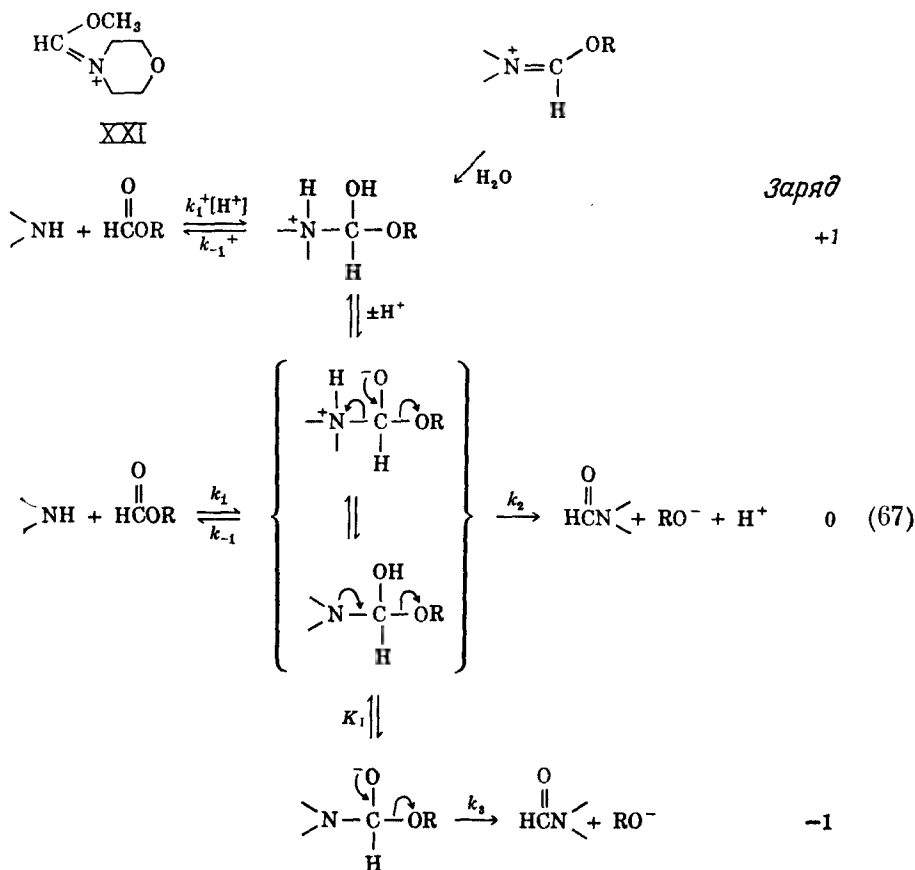


Рис. 17. pH-зависимость константы скорости псевдопервого порядка реакции гидразина (0,2 моль/л) в виде свободного основания с метилформиатом при 25 °C и ионной силе 1,5. Сплошная кривая вычислена по стационарному кинетическому уравнению для этой реакции [91].



При высоких значениях рН скорость реакции пропорциональна концентрациям эфира и свободного амина и не зависит от рН в соответствии с кинетическим уравнением

$$v = k_1 [\text{>NH}] [\text{HCOOR}]. \quad (68)$$

В этих условиях скорость определяющей стадией является атака эфира амином [схема (67) k_1] и переходное состояние не имеет заряда. (Скорость этой реакции для определенных аминов продолжает увеличиваться в щелочном растворе из-за катализа ионом гидроксила. Это особый случай общесосновного катализа на стадии атаки амином.) При понижении pH константы скорости уменьшаются и становятся прямо пропорциональными концентрации ионов гидроксила. Это соответствует тому, что скорость определяющей стадией становится основно катализируемый распад тетраэдрического промежуточного продукта присоединения [схема (67), k_3]. В этой области значений pH переходное состояние имеет заряд -1 и скорость реакции подчиняется кинетическому уравнению

$$v = k_3 [\text{I}^-] = k_3 \frac{k_1 K_I}{k_{-1} K_{II}} [\text{>NH}] [\text{HCOOR}] [\text{OH}^-]. \quad (69)$$

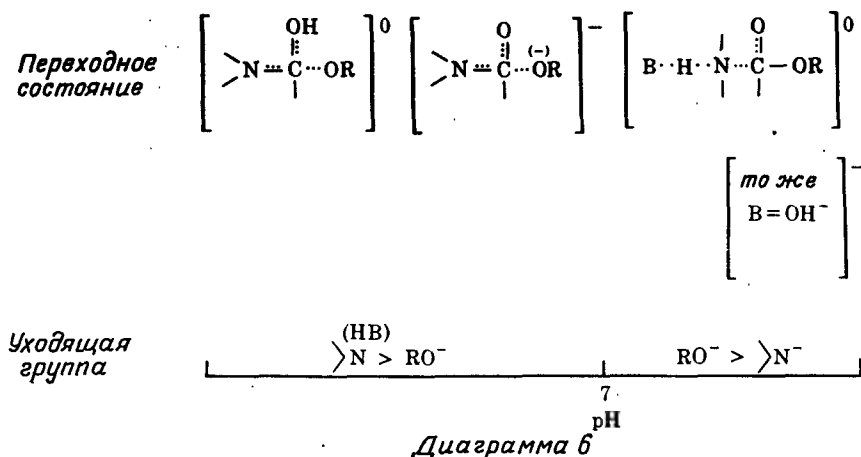
При дальнейшем понижении рН скорость реакции опять запределивается и основным становится не зависящий от рН распад промежуточного продукта [схема (67), k_2]. В этой области значений рН переходное состояние опять становится нейтральным и скорость реакции подчиняется кинетическому

уравнению

$$v = k_2 [I] = k_2 \frac{k_1}{k_{-1}} [>NH] [HCOOR]. \quad (70)$$

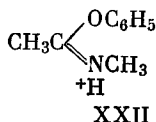
В области промежуточных значений рН и в случае соединений, для которых отдельные области нечетко разграничены, скорость следует описывать стационарным кинетическим уравнением. Другие амины ведут себя аналогичным образом, хотя по техническим причинам здесь невозможно рассмотреть все допустимые типы переходных состояний для каждого амина.

Установить, что скорость определяющей стадией при высоких значениях рН является атака амином, а при низких значениях рН — распад промежуточного продукта, стало возможным на том основании, что имидат XXI распадается при высоких значениях рН с образованием амида и спирта, а при низких с образованием эфира и амина. Это указывает направление с минимальной затратой энергии, по которому происходит распад промежуточного продукта присоединения, образованного из имидата или морфолина и сложного эфира при различных значениях рН. Смена скорость определяющей стадии при аминоллизе метилформиата морфолином происходит при том же значении рН ($\sim 7,6$), что и изменение в характере образуемых из имидата продуктов. Это отнесение стадий подтверждается далее более ранними сообщениями о том, что N-замещенные имидаты гидролизуются до эфиров в кислой среде и до амидов в щелочной [92, 93]. При увеличении основности амина значение рН, при котором происходит смена скорость определяющей стадии, возрастает [91]. Это свидетельствует о важной роли основности амина в определении типа распада промежуточного продукта присоединения: более основной амин легче протонируется и отщепляется, так что отщепление алколят-иона лимитирует скорость в большем интервале значений рН, чем в реакции с менее основным амином. (Эту тенденцию нельзя распространять на большую по размерам молекулу анилина, которая отщепляется легче, чем алколят-ион при значениях рН вплоть до 7 [13].) Предпочтительные пути распада тетраэдрического промежуточного продукта и механизм аминоллиза алифатических сложных эфиров сведены в диаграмму

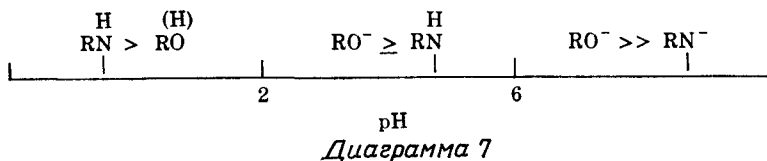


Обнаружение общекислотного катализа при аминоллизе эфиров [94, 95] означает, что существует также путь образования и распада промежуточного тетраэдрического продукта через катионное переходное состояние, отмеченный в схеме (67) константами k_1^+ и k_{-1}^+ [в схеме (67) не делается различий между общим и специфическим кислотным или основным катализом]. Все эти пути существенны при распаде промежуточного продукта, образованного

имидамом XXII [60, 96]. При $\text{pH} > 7$ это соединение распадается исключительно с отщеплением фенола, вероятно, по основно катализируемому пути k_3 . Между pH 2 и 5 оно распадается преимущественно с отщеплением фенола через нейтральное переходное состояние (k_2), но также происходит примерно на 10% отщепление амина через другое нейтральное переходное состояние (k_{-1}). Более низкое значение pH по сравнению с распадом XXI, при котором происходит переход от анионного к нейтральному переходному состоянию в этом случае, а также доминирование пути k_2 над k_{-1} при нейтральном распаде отражают тот факт, что фенолят является лучшей уходящей группой, чем метоксильный ион. Ниже pH 2 распад XXII происходит главным образом

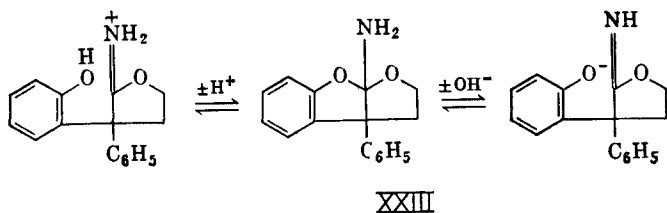


с образованием эфира по кислотно катализируемому пути через катионное переходное состояние (k_1^+ , k_{-1}^+). Установление этих преимущественных типов распада показывает, что если тетраэдрический промежуточный продукт образуется, то скорость аминоллиза фенилацетата в области pH , где обычно наблюдают аминоллиз, будет почти полностью определять атака амином. Однако до сих пор еще не было доказано образование тетраэдрического промежуточного продукта при аминоллизе фенилацетата и, возможно, что эта реакция идет по типу согласованной. То, что фенилацетаты быстро реагируют с третичными аминами, означает, что удаление протона с атома азота атакующего амина не является необходимой стадией в этих реакциях. Относительная легкость вытеснения уходящих групп при гидролизе фенилимидадов как функция pH показана на диаграмме



Эту схему можно применять также к аминолизу фениловых эфиров, однако это еще не было подтверждено.

Усиление тенденции к отщеплению от тетраэдрического промежуточного продукта кислородсодержащего фрагмента по сравнению с азотсодержащим по мере уменьшения основности кислорода иллюстрируется далее распадом имидадов бензолсульфоната и пикрата до соответствующих амидов [97], а также распадом стабильного промежуточного продукта присоединения XXIII преимущественно с отщеплением фенола, а не амина как в кислой, так и в щелочной средах [4]. Однако интерпретация последнего примера осложнена тем, что в XXIII невозможна самопроизвольная ионизация атомов кислорода.



Константы скорости аминоллиза сложных эфиров в условиях, когда скорость реакции определяет атака амином, сильно зависят от основности амина,

причем наклон β брэнстедовской логарифмической зависимости скорости реакции от основности приблизительно равен 0,8 [60, 98, 99]. Ряд таких кривых для реакций с замещенными фенилацетатами и подобными им соединениями приведен на рис. 18. Наклон этих линий слабо зависит от природы уходящей группы при изменении ее pK от 10 до 2. Далее

для первичных, вторичных и третичных аминов получаются кривые одного типа. Однако для реакций наиболее основных аминов с наиболее реакционноспособными эфирами происходит довольно резкое запределывание констант скорости в зависимости от основности. Здесь имеет место одинаково сильная зависимость констант скорости от pK уходящей группы для различных эфиров ($\beta \sim 1,0$) с переходом к более слабой зависимости для наиболее реакционноспособных соединений. Большая чувствительность к основности атакующей и уходящей групп означает, что должно происходить значительное изменение зарядов атакующего и уходящего атомов в переходном состоянии. Переходное состояние можно представить в виде XXIV, не уточняя, превращается ли оно в тетраэдрический промежуточный продукт или прямо в конечные продукты по согласованной реакции [60]. Это переходное состояние отличается от переходного состояния при атаке сложных эфиров основными кислородсодержащими

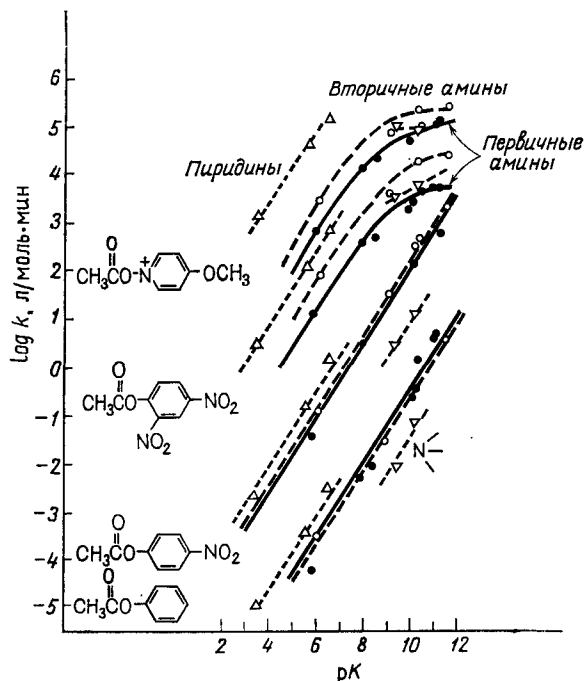
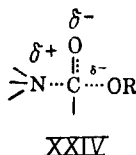


Рис. 18. Зависимость скоростей реакций аминов с замещенными фенилацетатами и 1-ацетокси-4-метокси-пиридином от основности нуклеофила [60].

анионами, где наблюдается гораздо меньшая чувствительность к основности и происходит меньшее изменение зарядов атакующей и уходящей групп. При взаимодействии сильноосновных аминов с реакционноспособными сложными эфирами происходит изменение природы переходного состояния таким образом, что изменение заряда атакующей и уходящей групп становится относительно небольшим и соответственно уменьшается чувствительность к их основности. Однако, по-видимому, скорость определяющая стадия заключается в атаке амином как для сильно-, так и для слабоосновных аминов.

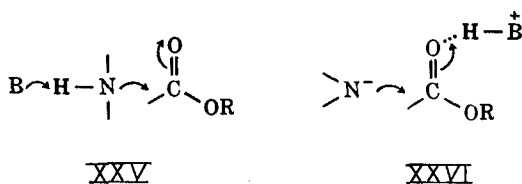


Гораздо большей чувствительностью стадии атаки нуклеофилом к природе уходящей группы при аминоллизе, чем при гидролизе, обусловлено также то, что тиоэфиры с их относительно хорошими уходящими группами

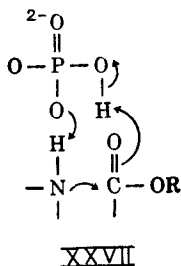
Гораздо большей чувствительностью стадии атаки нуклеофилом к природе уходящей группы при аминоллизе, чем при гидролизе, обусловлено также то, что тиоэфиры с их относительно хорошими уходящими группами

более реакционноспособны по отношению к аминам, чем кислородсодержащие эфиры, хотя скорости щелочного гидролиза эфиров обоих типов очень близки [100, 101].

При аминоллизе сложных эфиров возможны как общесредовой, так и общекислотный катализ [94, 102, 103]. Установление скорости определяющих стадий при аминоллизе метилформиата [91] делает возможным установление механизма катализа, так как кинетику каталитических реакций исследовали в таких экспериментальных условиях, когда скорость определяющей катализируемой стадией является атака эфира амином. Механизм общесредового катализа должен быть таким, каким он изображен на схеме XXV, так как по альтернативному механизму XXVI необходимо образование неустойчивого аниона амина ($pK_a \sim 30$) по предварительной равновесной стадии, и этот неустойчивый промежуточный продукт должен реагировать с эфиром с константой скорости, намного большей, чем константы скорости процессов, лимитируемых диффузией, чтобы объяснить наблюдаемую скорость аминоллиза.



Члены, независимые от pH и пропорциональные концентрации ионов гидроксила в кинетическом уравнении стадии атаки нуклеофилом, вероятно, отражают общесредовой катализ водой и ионом гидроксила соответственно. Согласованный кислотно-основной катализ (XXVII) обеспечивает дополнительную стабилизацию переходного состояния стадии атаки нуклеофилом в некоторых из этих реакций [13, 91].

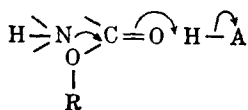


Получить брэнстедовскую зависимость для удаления протона при общесредовом катализе аминоллиза трудно, так как катализ в этих реакциях обычно обнаруживают экспериментально по появлению в кинетическом уравнении члена второго порядка по концентрации амина. Это значит, что невозможно варьировать катализатор и нуклеофил независимо. Однако брэнстедовские зависимости, построенные на основании реакций, катализируемых водой и амином, дают значения β , последовательно возрастающие при уменьшении основности амина от 0,19 для метиламина до 0,26 для этилового эфира глицина и до 0,37 для гидроксиламина. Аналогично брэнстедовские зависимости, построенные на основании реакций, катализируемых водой и ионом гидроксила, дают значения β , возрастающие с понижением основности вторичных аминов от 0,22 для пиперидина до 0,27 для диметиламина и до 0,37 для морфолина*. Эти изменения происходят в направлении, ожидаемом для общесредового катализа, согласно механизму XXV. В реакции метоксиамины

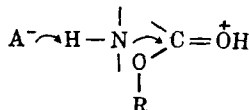
* Вычислено по данным Дженкса и др. [94, 104].

с *n*-нитрофенилацетатом происходит общесредовой катализ карбоксилатными ионами, так что здесь имеется возможность исследования различных катализаторов в реакции с одним амином [105]. Для катализа в этой реакции $\beta = 0,45$.

Общекислотный катализ на стадии атаки нуклеофилом можно представить механизмами



XXVIII

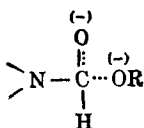


XXIX

Альтернативный механизм, в котором протон подается на спиртовый атом кислорода, менее вероятен. Для осуществления механизма XXIX необходимо образование неустойчивой сопряженной кислоты эфира в предварительной равновесной стадии. Этот механизм исключен, так как для того, чтобы объяснить наблюдаемую скорость реакции, неустойчивый промежуточный продукт должен взаимодействовать с амином с константой скорости, большей, чем константы скорости реакций лимитируемых диффузией. Так, при общекислотном катализе гидразинолиза фенилацетата для этой стадии необходима константа скорости 10^{15} л²/моль²·с, если принять величину pK сопряженной кислоты эфира равной -6 [106].

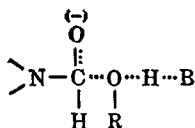
При взаимодействии ацетилимидазола с гидроксилсодержащими соединениями, включая воду, спирты и гидроксамовые кислоты, но не фосфатный или карбоксилатный ионы, идет общесредовой катализ [107]. Механизм этого катализа не установлен.

Распад тетраэдрического промежуточного продукта происходит наиболее быстро по реакции, катализируемой ионом гидроксила (например, XXX).

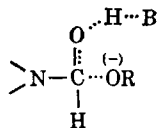


XXX

На этой стадии также возможен общесредовой катализ, хотя здесь он гораздо менее значителен, чем на стадии атаки [91]. Пока еще невозможно сделать определенный выбор между простейшими механизмами катализа XXXI и XXXII; возможны также механизмы «одного столкновения».



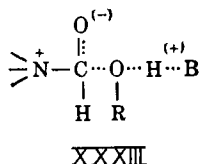
XXXI



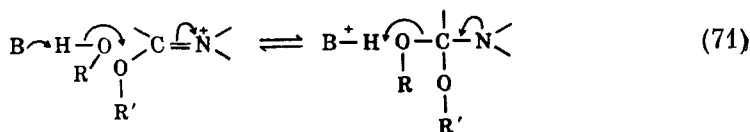
XXXII

Катализируемый ионом гидроксила распад может представлять собой специфический случай одного из этих механизмов, когда $\text{B} = \text{OH}^-$. Механизм XXXIII ($\text{BH} = \text{NOH}$), по-видимому, объясняет реакцию третичных аминов

с фениловыми эфирами



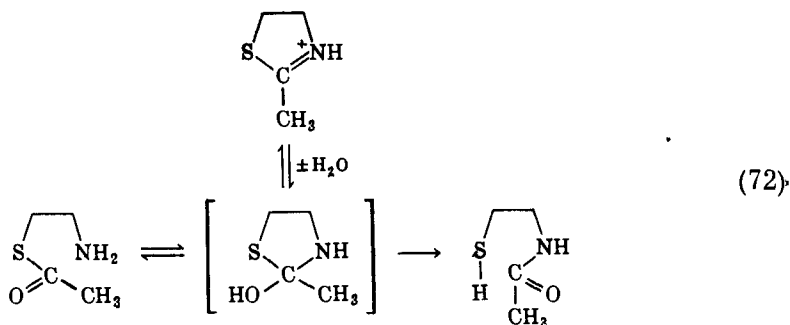
При гидролизе сопряженной кислоты этилбензимидаата и N-фенилиминолактона возможен общесосновной катализ [8, 13]. Так как известно, что скорость гидролиза N-фенилиминолактона определяет стадия атаки водой и что субстрат протонирован в условиях, когда наблюдают катализ, то данной реакции вполне надежно можно приписать механизм



Эта стадия в обратном направлении представляет собой редкий случай механизма общекислотного катализа при аминоллизе эфира в условиях, когда скорость определяющая стадия состоит в отщеплении спирта. Рассмотренный механизм совпадает с механизмом присоединения и отщепления воды в простых реакциях карбонильной группы.

10. RCSR и $\text{H}_2\text{NR}'$

При внутримолекулярном аминоллизе S-ацетилмеркаптоэтиламина [схема (72), слева направо] в области $\text{pH} \sim 3$ происходит смена скорости определяющей стадии. Выше этого значения pH реакция идет по не зависящему



от pH и основно каталитическому механизмам; при $\text{pH} < 3$ реакция идет медленнее, но скорость ее опять пропорциональна концентрации ионов гидроксидов [108]. При $\text{pH} > 3$ существует также нелинейная зависимость скорости от концентрации буфера, которая вызвана переходом от скорости определяющей стадии, катализируемой буфером, к скорости определяющей стадии, где этот катализ отсутствует [109]. Таким образом, в этой реакции должны существовать по крайней мере две стадии и один промежуточный продукт.

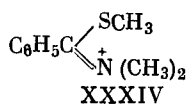
При взаимодействии тизофиров с гидроксиламином также происходит смена скорости определяющей стадии при изменении концентрации ионов водорода, и оно должно идти через образование промежуточного продукта.

[110]. Как при образовании, так и при распаде этого промежуточного продукта возможен общий кислотно-основной катализ. Общий кислотно-основной катализ существует также в реакции ацетилимидазола с тиолами и в ряде реакций тиоэфиров с аминами [107, 111—113]. Выше нейтральной области рН аминолиз тиоэфиров подчиняется кинетическому уравнению,

$$\text{скорость} = k_1 \overset{\text{O}}{\parallel} \text{RCSR}' [\text{RNH}_2] + k_2 \overset{\text{O}}{\parallel} \text{RCSR}' [\text{RNH}_2] [\text{B}], \quad (73)$$

откуда можно заключить, что для любой стадии, определяющей скорость реакции в этой области рН, общий заряд переходного состояния равен нулю (за исключением особого случая, когда $\text{B} = \text{OH}^-$). При более низких значениях рН кинетика становится более сложной.

Природу скорость определяющей стадии можно установить, анализируя продукты гидролиза имидата, который создает тот же тетраэдрический промежуточный продукт присоединения, что и в реакции аминолиза кислородсодержащих эфиров. Из ранних качественных результатов известно, что в кислой среде тиоимидаты обычно распадаются до тиоэфиров, однако в щелочной среде в некоторых случаях наблюдают распад до амидов, если невозможно элиминирование нитрила; так, при гидролизе соединения XXXIV в щелочной среде отщепляется тиолат-анион с образованием N-диметилбензамида [114]

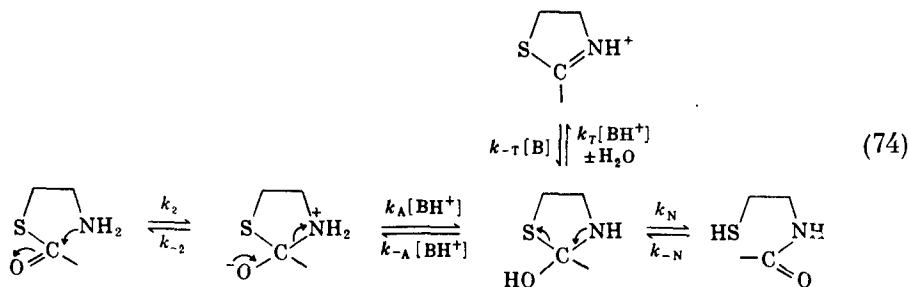


Подробное количественное исследование показало, что переходная область для ряда различных имидатов находится в пределах рН 2...3; ниже этого значения рН энергетически выгоден распад тетраэдрического промежуточного продукта, образованного имидатом, с выделением амина и сложного эфира, а при $\text{pH} > 4$ энергетически выгодно отщепление тиола с образованием амида [101]. В этой области рН отщепление амина и выход сложного эфира возрастают в присутствии общих кислотно-основных катализаторов. Изменение выхода продуктов независимо от скорости гидролиза имидата служит доказательством существования в реакции промежуточного продукта.

Эти результаты указывают, что в области высоких значений рН скорость определяющая стадия реакции аминолиза должна состоять в атаке амином и образовании промежуточного продукта через незаряженное переходное состояние; образовавшись, промежуточный продукт быстро распадается с отщеплением тиола, как следует из анализа продуктов гидролиза имидата. При низких значениях рН скорость определяющей стадией должен быть распад тетраэдрического промежуточного продукта с отщеплением тиола, однако обычно реакции аминолиза не изучают в этой области значений рН, так как амин здесь почти полностью протонирован. Можно попытаться представить эти выводы посредством той же схемы, что и для аминолиза кислородных эфиров [схема (67)].

Однако при применении упомянутой схемы к внутримолекулярному аминолизу S-ацетилмеркаптоэтиламина возникают серьезные противоречия [80, 109, 115, 116]. Тетраэдрический промежуточный продукт для данной реакции образуется при гидролизе 2-метил- Δ^2 -тиазолина [схема (72)]. В этой реакции происходит смена скорость определяющей стадии при понижении рН, что представляет собой по существу первый описанный пример использования этого кинетического критерия для установления существования промежуточного продукта в реакции на ацильном уровне окисления [115]. В кислом растворе при распаде промежуточного продукта образуются приблизительно равные количества тиоэфира и амида, причем их относительный выход не зависит от рН. В этих условиях рН-зависимость скорости реакции

аминолиза обусловлена скоростью определяющей стадией с нейтральным переходным состоянием. Так как образование тиола и амина из промежуточного продукта происходит с примерно одинаковой легкостью, обе стадии $S \rightarrow N$ переноса должны определять скорость реакции и идти через нейтральные переходные состояния. Проблема возникает из-за того, что с ростом pH происходит смена скорости определяющей стадии в реакции аминолиза. Это в свою очередь сопровождается уменьшением выхода тиозфира при гидролизе тиазолина (не вызванного вторичной реакцией трансацилирования), т. е. происходит уменьшение скорости образования промежуточного продукта из тиоэфира, и, следовательно, эта стадия становится скоростью определяющей, а вытеснение из промежуточного продукта тиола с образованием амида становится относительно быстрым. Изменение скорости определяющей стадии нельзя объяснить при помощи схемы типа (67) или (72), где скорость определяется только образованием или распадом связей с углеродом, так как оба пути превращения промежуточного продукта идут через переходные состояния с одинаковыми зарядами и нет причин, по которым скорость должна падать ниже того, что следует ожидать для этих стадий с ростом pH. Полученные результаты свидетельствуют о том, что должна быть другая стадия, становящаяся скоростью определяющей с ростом pH, причем эта стадия должна быть простым переносом протона. Экспериментальные данные можно объяснить посредством схемы (74), которая включает такую стадию (k_A). Она заключается в переносе протона к первоначально образуемому диполь-



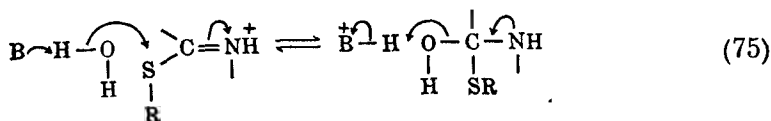
ному промежуточному продукту присоединения, за которым следует быстрая потеря протона атомом азота и вытеснение тиола. Обе стадии переноса протона могут происходить по механизму одного столкновения или по согласованному механизму с участием кислотно-основного катализатора, однако, чтобы процесс начался, необходим какой-нибудь кислотный катализатор. Подтверждением вывода, что скорость определяющим становится перенос протона, служит то, что $\alpha = 0,03$ для общеизвестного катализа карбоновыми кислотами и фосфатным моноанионом в соответствии с механизмом (74). Эта величина α в пределах ошибки эксперимента равна нулю, что и следовало ожидать для простого диффузионно контролируемого переноса протона [116, 117]. Катализ удается обнаружить по падению каталитической константы «водной» реакции (скорость определяющая стадия при высоких значениях pH) ниже брэнстедовской прямой, как следовало бы ожидать в случае, если перенос протона с этой слабой кислоты идет с константой скорости, меньшей, чем диффузионный предел. Оценка абсолютных значений констант скорости отдельных стадий этой схемы приводит к разумным величинам, если принять $k_A \approx 10^{10}$ л/моль · с. Возможно, что катализуемый общими кислотами метоксиаминолиз фенилацетата, где также $\alpha \sim 0$ для катализа карбоновыми кислотами [105], идет через такую же скорость определяющую стадию переноса протона.

Отсюда следует важный вывод, что возможен общий кислотно-основной катализ, включающий только простой диффузионный перенос протона,

и что смена скорость определяющей стадии может вызываться предельной скоростью этого переноса протона, даже если общая скорость реакции невелика. В данной реакции присоединение амина к тиозфиру приводит к образованию диполярного промежуточного продукта, который немедленно распадается на исходные вещества, если этому не препятствует присоединение протона к аниону кислорода, уничтожающее движущую силу отщепления амина.

Понижение выхода тиозфира при гидролизе тиазолина с повышением рН является следствием того, что для вытеснения амина в условиях, когда скорость определяется переносом протона к диполярному промежуточному продукту присоединения, необходимо катионное переходное состояние. Тот же механизм позволяет вполне обоснованно объяснить изменение соотношения продуктов гидролиза нециклических имидатов при изменении рН, но это не было доказано.

На первой стадии гидролиза тиазолина [k_{-T} , схема (74)] идет общесосновной катализ. Так как в области рН, где наблюдают катализ, тиазолин протонирован, механизм этой стадии можно совершенно определенно представить схемой



Это такой же механизм, как и для гидратации иминов и имидатов.

Механизм реакций этого класса можно приблизительно представить диаграммой

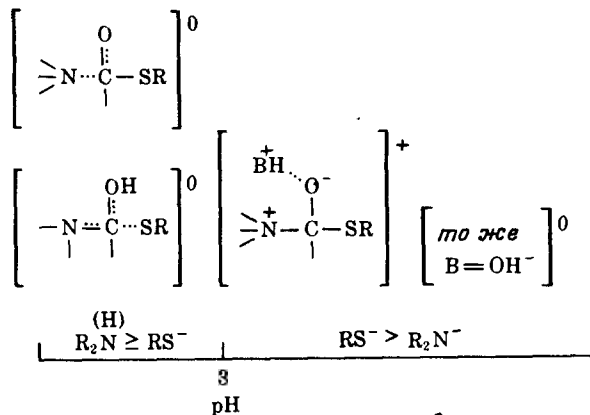


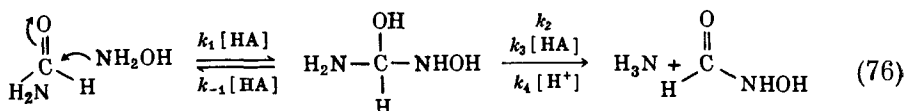
Диаграмма 8

Изменение природы уходящей группы при изменении рН, по-видимому, является результатом существования скорость определяющей стадии переноса протона по крайней мере для внутримолекулярных реакций.

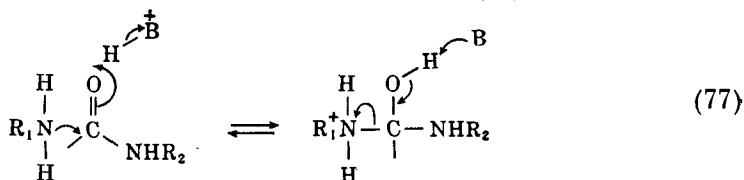


В реакции формамида с гидроксиламином с образованием формилгидроксамовой кислоты возможен общекислотный катализ ионом гидроксилламмония. При постоянном значении рН с ростом концентрации катализатора происходит смена скорость определяющей стадии, что служит доказательством обра-

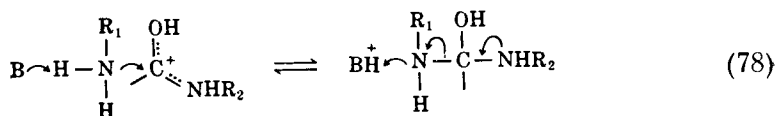
зования в реакции промежуточного продукта [разд. А, 3, схема (76)].



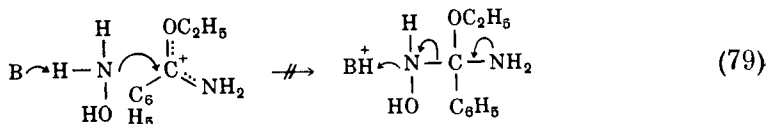
Катализ идет как при распаде, так и при образовании промежуточного продукта, и смена скорость определяющей стадии происходит из-за того, что одна из стадий идет со значительной скоростью некаталитически, т. е. обладает меньшим значением α для общекислотного катализа. Природа скорость определяющей стадии в этой реакции при разных концентрациях катализатора не установлена, однако из характера аналогичных реакций и корреляций между строением и реакционной способностью можно заключить, что механизм (76) более вероятен, чем механизм с обратным отнесением стадий, где стадия распада является скоростью определяющей при низких, а стадия нуклеофильной атаки — при высоких концентрациях катализатора. При отщеплении азота почти всегда необходимо присоединение протона, так что уходящая группа скорее представляет собой свободный амин, чем неустойчивый анион амина. Вследствие этого основность азота, как правило, даже важнее, чем легкость отщепления протонированного атома азота для обеспечения ухода аминов. Так, гидролиз 5-10-метилентетрагидрофолевой кислоты идет с отщеплением более основного атома азота N^{10} с образованием N^{10} -формильного соединения в качестве продукта [118]. Можно, следовательно, ожидать, что промежуточный продукт присоединения в схеме (65) будет распадаться главным образом с отщеплением аммиака так, что скорость определяющей стадией при низких концентрациях катализатора будет общекислотно катализируемая атака гидроксиламином. При увеличении концентрации катализатора скорость определяющей стадией становится отщепление аммиака. Для механизма катализа, представленного схемой (77), это значит, что



присоединение и отщепление слабоосновной молекулы гидроксиламина происходит с большим значением α (или с меньшим значением β для обратной реакции), чем присоединение и отщепление аммиака (которое идет со значительной скоростью по реакции, катализируемой водой), как и следовало ожидать из корреляций между строением и реакционной способностью. Альтернативный механизм катализа, изображенный схемой (78), невозможен, так



как отсутствует общий кислотно-основной катализ атаки этилбензимидаата гидроксиламином [схема (79)], моделирующий этот механизм [8]



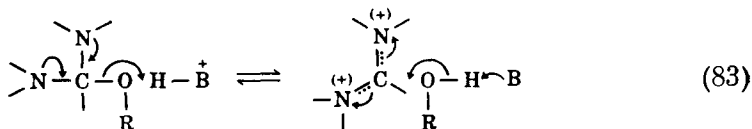
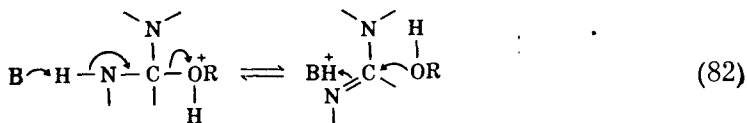
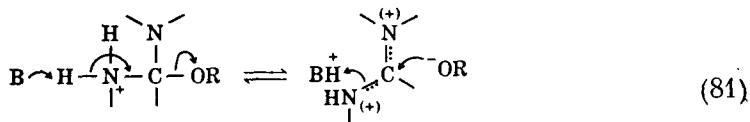
Общий кислотно-основной катализ важен для реакций гидроксиламина со сложными эфирами и амидами, тогда как для присоединения гидроксил-амина к альдегидам и кетонам он играет незначительную роль. Реакции ацильной группы более сложны, так как резонансная стабилизация исходного состояния должна быть в значительной степени нарушена для достижения переходного состояния. Очевидно, общий кислотный или основной катализ может обеспечить большую свободную энергию стабилизации этих высокоэнергетических переходных состояний, чем для переходных состояний в более простых реакциях карбонильной группы.

При быстрых реакциях ацетилимидазола и иона ацетилимидазолия с аминами возможен общеоосновной катализ [107], однако механизм катализа не был установлен.

Аминолиз имидоэфиров является аналогичной реакцией, которая идет через промежуточный продукт присоединения той же структуры, что и при аминолизе амидов, за исключением того, что образование аниона кислорода в случае имидата невозможно. Смена скорость определяющей стадии и разделение промежуточного продукта присоединения в этой реакции при различных значениях pH обсуждались в разд. А, 2, и было отмечено, что атака имидоэфирного катиона амином происходит без общекислотного или общеоосновного катализа. При образовании амидина из промежуточного продукта, полученного с сильноосновными аминами, отсутствует заметный общекислотный или общеоосновной катализ, однако при распаде промежуточного продукта, образованного менее основными гидроксил-аминами, метоксиамином и семикарбазидом, происходит значительный общеоосновной катализ, подчиняющийся кинетическому уравнению

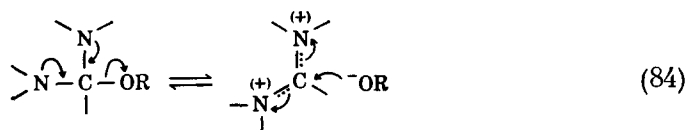
$$\text{скорость} = k [\text{имидат} \cdot \text{H}^+] [\text{RNH}_2] [\text{B}]. \quad (80)$$

Этот катализ может осуществляться по кинетически эквивалентным механизмам (81) — (83). Механизм (81) невероятен, так как катализ наблюдают



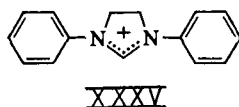
в условиях, когда заметная доля промежуточного продукта должна уже находиться в виде свободного основания, так что удаление протона может дать лишь небольшой выигрыш, а при обратной реакции (т. е. гидролизе) должно было бы происходить присоединение протона к катионному амидину. Механизм (82) также невозможен, так как в соответствии с ним при обратной реакции необходима подача протона на амидин в виде свободного основания в экспериментальных условиях, когда амидин уже протонирован. Механизм (83), следовательно, наиболее вероятен, хотя его справедливость не была твердо доказана. Он согласуется с тем, что на основании зависимости между

строением и реакционной способностью следует ожидать, что сильно основные амины могут вытеснять алкоголь-ион без помощи катализатора [схема (84)], в то время как менее основные амины нуждаются в помощи общего



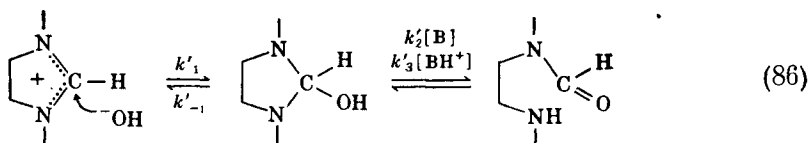
основного катализатора для вытеснения спирта. Это вполне эквивалентно тому, что было обнаружено для стадии дегидратации в простых реакциях карбонильной группы, где сильноосновные амины могут непосредственно вытеснять ион гидроксила, в то время как вытеснение слабоосновных аминов происходит главным образом по механизму общекислотного катализа [схема (17)], аналогичного механизму (83).

Образование проявляющегося кинетически промежуточного продукта при гидролизе формамидина было показано тем, что 1) гидролиз хлорида дифенилимидазолия (XXXV) имеет второй порядок по основанию, как



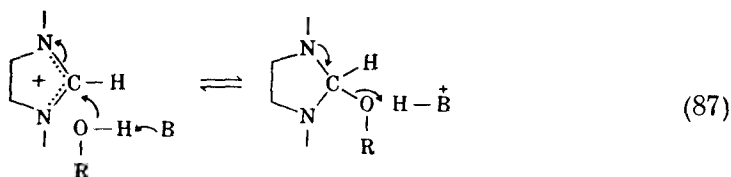
и в случае ряда других гидролитических реакций, в которых скорость определяющая стадия заключается в отщеплении плохой уходящей группы от промежуточного продукта присоединения, и 2) при гидролизе метинилтетрагидрофоловой кислоты происходит уменьшение каталитической константы скорости с ростом концентрации катализатора, что указывает на смену скорость определяющей стадии [118]. Кинетическое уравнение первой реакции представлено уравнением (85), а ее механизм — схемой (86). Доказательства смены скорость определяющей стадии при изменении pH отсутствуют.

$$\text{скорость} = k_1 [S^+] [OH^-] [BH^+] + k_2 [S^+] [OH^-] [B] \quad (85)$$

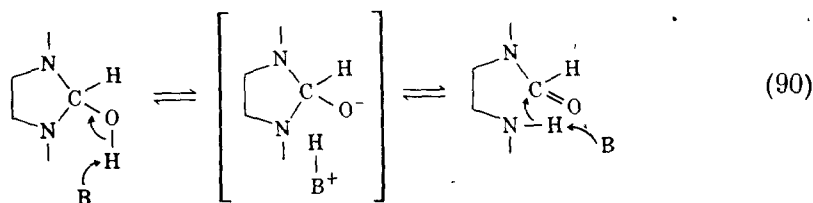
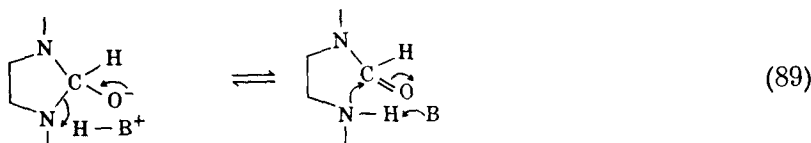
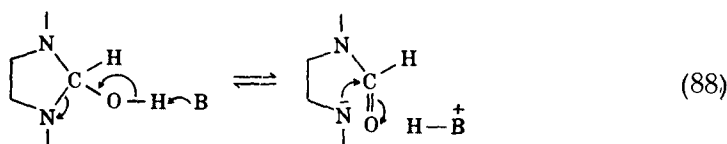


Следовательно, распад промежуточного соединения на конечные продукты должен определять скорость реакции, и промежуточное соединение должно распадаться предпочтительно с отщеплением иона гидроксила или воды, а не амина или его аниона при любом значении pH. Эта ситуация противоположна той, которая создается при аминолизе имидата, где в таком же промежуточном продукте более основной атом азота протонируется и преимущественно отщепляется в кислом растворе. Тенденция к смене скорость определяющей стадии при переходе к низким значениям pH у менее основных аминов уже заметна в реакциях имидоэфиров с гидроксиламином и семикарбазидом; в ионе дифенилформамидиния оба атома азота слабоосновны и в обычно доступной области pH не происходит смены скорость определяющей стадии.

При низких концентрациях буфера гидролиз 5-10-метинилтетрагидро-
 фолиевой кислоты подчиняется тому же кинетическому уравнению, что и гид-
 ролиз соединения XXXV, и, вероятно, имеет ту же скорость определяющую
 стадию. При увеличении концентрации буфера происходит переход к новой
 скорости определяющей стадии, которая в основном катализируется ионом
 гидроксила и для которой катализ буфером менее существен (величина β
 больше). Эта стадия, вероятно, представляет собой скорость определяющую
 атаку формамидиниевого кольца ионом гидроксила или водой [k'_1 , схема (86)].
 На этой стадии имеет место общесосновной катализ. Так как субстрат уже
 является катионом, можно вполне надежно приписать этой стадии механизм
 (87). Это тот же механизм, что и для второй стадии аминолита имидоэфиров
 [схема (83)], что подтверждает справедливость приписанного ей механизма.

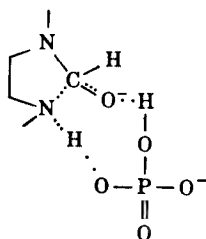


Общесосновной катализ распада промежуточного продукта присоеди-
 нения при гидролизе формамидинов может идти по механизмам (88) и (89),



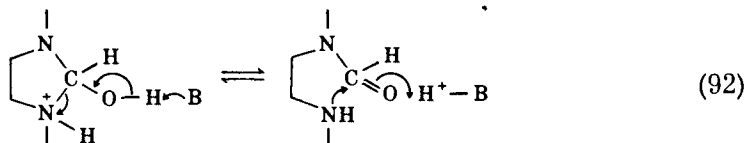
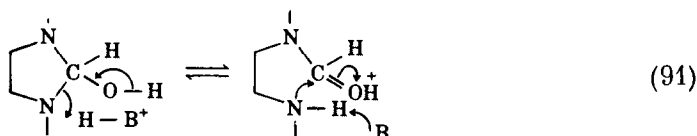
а также по согласованному механизму или по механизму «одного столкнове-
 ния», где осуществляется катализ обоих типов [т. е. схема (90)]. Механизм
 (88) исключается, так как для его осуществления необходимо образование
 аниона анилина, который был бы слишком неустойчивым промежуточным
 продуктом, чтобы реакция могла идти с наблюдаемой свободной энергией
 активации [118]. Повышенная каталитическая активность бикарбоната
 и фосфатного дианиона по сравнению с дианионом метилфосфата указывает
 на то, что бифункциональный кислотно-основной катализ в этих реакциях
 несколько более эффективен, чем монофункциональный катализ. Механизм
 его можно представить аналогично механизму (89) с небольшой дополни-
 тельной стабилизацией переходного состояния водородной связью с кислотной

группой бифункционального катализатора XXXVI

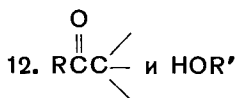


XXXVI

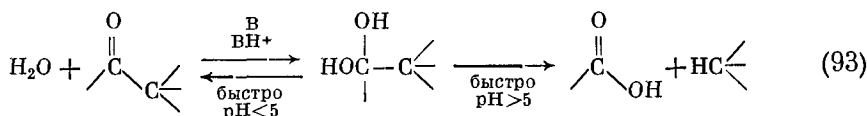
Общекислотный катализ распада промежуточного продукта может осуществляться по механизмам (91) или (92). Если эту реакцию представить



как общесосновной катализ атаки амином протонированного амида [схема (91) в обратном направлении], то она обладает величиной $\beta = 0,44$. Последний результат вызывает сомнения, так как величина β для атаки протонированного амида должна быть меньше, чем для атаки свободного амида, которая идет по аналогичному механизму (89) с величиной $\beta = 0,26$. Это подтверждает механизм (92), справедливый и для других реакций, в которых амин атакует карбонильную группу. Этот механизм подтверждается далее тем, что атака имидоэфиров аминами идет по механизму (91), где протон гидроксильной группы замещен алкильной группой, но в рассматриваемой реакции не наблюдается общий кислотно-основной катализ; если распад тетраэдрического промежуточного продукта при гидролизе амидиния идет по тому же механизму, в нем также не должно быть общего кислотно-основного катализа.



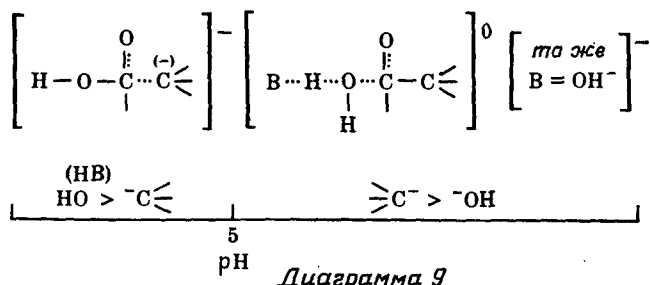
При гидролитическом отщеплении ацетильной группы диэтилацетилмалоната и диэтилацетилэтилмалоната происходит смена скорость определяющей стадии при изменении pH и при изменении концентрации буфера при постоянном значении pH, что указывает на образование в этой реакции промежуточного продукта [схема (93)] [119]. На стадии, определяющей скорость реакции в области значений $\text{pH} > 5$,



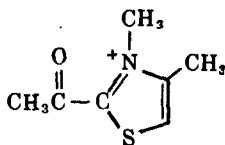
происходит общий кислотно-основной катализ. Хотя кинетические данные сами по себе не позволяют установить природу скорости определяющих ста-

дий при различных значениях pH, можно полагать, что скорость определяющей стадией при низких значениях pH является разрыв связи углерод — углерод, а при высоких значениях pH — гидратация карбонильной группы. Подтверждением этому служит сопоставление абсолютных значений констант скорости в различных областях pH с абсолютными значениями констант скорости реакций с известным механизмом и тот факт, что при гидратации карбонильных соединений возможен общий кислотно-основной катализ. Промежуточный продукт отщепляет воду преимущественно при низких значениях pH и уходящую группу, содержащую атом углерода, при высоких значениях pH, как показано на диаграмме 9. Гидролиз ацилцианидов RCOCN обладает теми же кинетическими параметрами и тем же механизмом [120].

При гидролизе ацетилтиазолина XXXVII обе стадии реакции можно наблюдать непосредственно, так как промежуточный продукт присоединения накапливается в значительных количествах. Стадия гидратации катализируется ионом гидроксила, водой и общими основаниями, а стадия распада



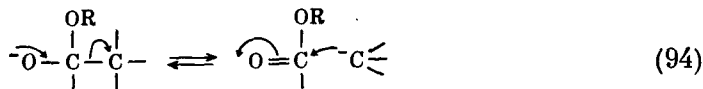
промежуточного продукта идет только по механизму специфического основ-



XX XVII

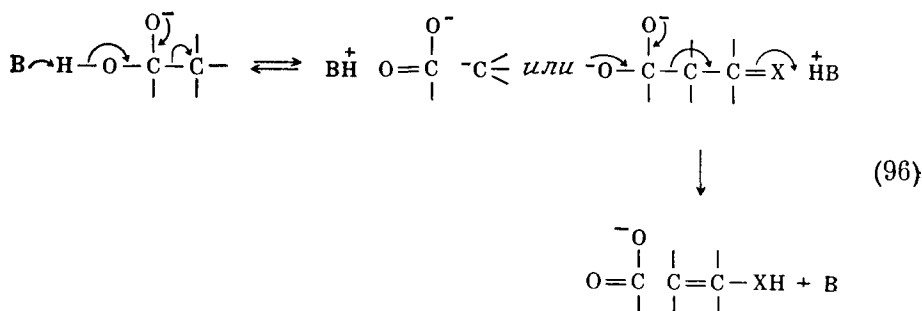
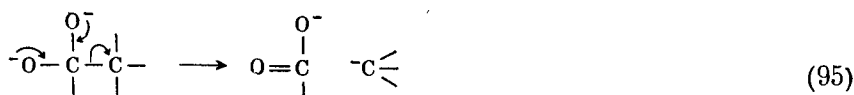
ного катализа. В этой реакции скорость распада всегда медленнее, чем скорость гидратации, так что при изменении pH не происходит смены скорости определяющей стадии [121].

Детали механизма стадии гидратации в этих реакциях, вероятно, те же, что и в других реакциях гидратации кетонов. Вытеснение карбаниона из анионного промежуточного продукта происходит без общего кислотно-основного катализа и может быть представлено схемой (94). Механизм не зависящего от pH отщепления углеродсодержащей уходящей группы неизвестен.

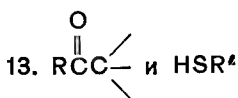


Как можно было ожидать, изменение природы углеродсодержащей группы приводит к изменению природы скорости определяющей стадии как функции рН. Кинетические уравнения щелочного расщепления ацетилацетона [122] 2,6-дигалогенбензальдегидов [123] и хлоральгидрата [124] содержат члены второго порядка по концентрации основания. Это значит, что при гидролизе этих соединений, имеющих относительно плохие уходящие группы,

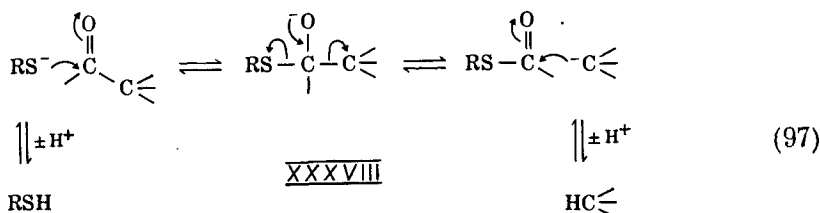
скорость при щелочных значениях pH определяется распадом промежуточного продукта присоединения и для отщепления карбаниона необходима движущая сила фактически существующего [схема (95)] или потенциально существующего [схема (96)] дианиона



При гидролизе 2-нитроацетофенона, нитроацетона и теноилтрифторацетона, имеющих лучшие уходящие группы, происходит смена скорость определяющей стадии при изменении pH, которая аналогична смене скорость определяющей стадии в ряду ацетилмалонатов [125].



Отношение констант скорости атаки тиолатным анионом и ионом гидроксила $k_{\text{RS}}/k_{\text{OH}}$ для реакций с ацетильной группой диэтилацетилмалоната примерно на три порядка меньше, чем для реакций с *n*-нитрофенилацетатом или ацетилимидазолиевым ионом, где атака ацильной группы обоими нуклеофилами почти несомненно является скоростью определяющей стадией [126]. Так как известно, что атака ионом гидроксила является скоростью определяющей стадией при щелочном расщеплении диэтилацетилмалоната [119], низкая реакционная способность тиольного аниона по отношению к этому соединению, вероятно, вызвана изменением скорости определяющей стадии (закрывающейся теперь в распаде промежуточного продукта присоединения XXXVIII), в котором отщепление тиолатного аниона (pK 9,95) происходит легче, чем отщепление диэтилмалонатного аниона [pK 15,2, схема (97)].



В соответствии с принципом микроскопической обратимости скорость определяющей стадией в обратном направлении должна быть в этом случае атака тиоэфира карбанионом. Подобную ситуацию можно наблюдать непосред-

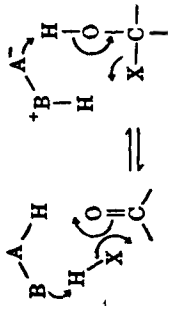
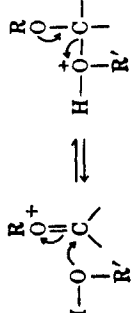
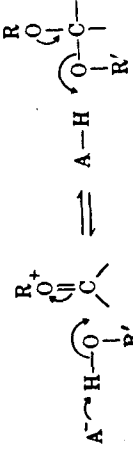
ственно в реакции тиолов с ионом ацетилимидазолия, где образование тиолового продукта присоединения идет легко, а превращение в тизоэфир в водном растворе не происходит. Очевидно, для отщепления углеродсодержащей уходящей группы необходима дополнительная движущая сила, создаваемая свободной электронной парой второй гидроксильной группы, так как гидролиз кислородных продуктов присоединения идет легко. Подача электронов от атома серы для образования частично двойной связи с углеродом осуществляется с трудом, поэтому продукт присоединения тиола легче распадается с отщеплением тиола, чем углеродной уходящей группы [121]. Вероятно, для более кислых углеродных соединений будет происходить смена скорость определяющей стадии и скорость определяющим станет присоединение и отщепление тиольного иона, однако неизвестно, в какой момент это произойдет. Отсутствуют указания о существовании в этих реакциях общего основного катализа (в условиях, когда ионизация карбокислоты не является скоростью определяющей). Вероятно, здесь непосредственно взаимодействуют свободные анионы углеродного соединения и тиола.

ТАБЛИЦА РАССМОТРЕННЫХ МЕХАНИЗМОВ

Приведенная ниже таблица состоит из двух частей: в первой из них представлены реакции, в которых непосредственным продуктом или реагентом является карбонильная группа >C=O , во второй — реакции, в которых непосредственным продуктом или реагентом является имино-группа >C=N —. Двухстадийные реакции часто включают по одной стадии каждого типа.

Некатализируемая реакция может оказаться реакцией, в которой необходимые переносы протона осуществляются в быстрых стадиях до или после переходного состояния (специфический кислотный или основной катализ), или реакцией, в которой истинный кислотный или основной катализ существует, но величина α или β слишком близка к нулю или единице, чтобы можно было этот катализ обнаружить. Сокращения ОКК и ООК означают общекислотный катализ и общесредний катализ соответственно. Порядок употребления этих терминов соответствует прямому и обратному направлениям рассматриваемой реакции, т. е. общекислотный катализ в прямом направлении, как правило, требует общесреднего катализа в обратном направлении той же реакции. Быстрые равновесные стадии переноса протона (специфический кислотный или основной катализ) опущены. В некоторых случаях возможен также согласованный механизм или механизм «одного столкновения». Приведенные ниже механизмы катализа считают основными, обеспечивающими стабилизацию переходного состояния.

1. >C=O	Карбонильные производные	Ацильные производные
»Некатализируемый» ($\alpha = 0, \beta = 1, 0$) $\text{X} \rightarrow \text{>C=O} \rightleftharpoons \text{X}^+ \text{---} \overset{+}{\underset{ }{\text{C}}} \text{---} \overset{-}{\underset{ }{\text{O}}} \text{---}$	Алифатические амины Карбанионы Сульфит Основные тиольные анионы Алколятный и гидроксильный ионы Гидроперекисный анион	Алколятный и гидроксильный ионы: сложные эфиры тиоэфиры анилиды Тиолатный анион: сложные эфиры гидролиз тиазолинов аминолиз тиоэфиров ацетилмалонаты Карбанионы: кислоты тиоэфиры
OKK-OKK $\text{X} \rightarrow \text{>C=O} \quad \text{H-A} \rightleftharpoons \text{X}^+ \text{---} \overset{+}{\underset{ }{\text{C}}} \text{---} \overset{-}{\underset{ }{\text{O}}} \text{---} \text{H} \quad \text{A}^-$	Слабоосновные амины Свободные тиолы Слабоосновные тиольные анионы RON ROOH (?)	Гидроксилмин — амиды Амины — сложные эфиры и тиоэфиры Гидролиз амидинов
OKK-OKK $\text{A}^- \text{---} \text{H} \text{---} \text{X} \rightarrow \text{>C=O} \rightleftharpoons \text{A} \text{---} \text{H} \text{---} \overset{+}{\underset{ }{\text{X}}} \text{---} \overset{-}{\underset{ }{\text{C}}} \text{---} \overset{-}{\underset{ }{\text{O}}} \text{---}$	RON ROOH Амиды	RON — тиоэфиры Амины — сложные эфиры RON — сложный эфир (вероятно) RON — амиды (?) Амин — анион (гидролиз формамида)

1. >C=O	Карбонильные производные	Ацильные производные
Согласованный 		Анилин — лактон Анилин — форманилид (вероятно, при гидролизе метилентетрагидрофолата) Гидролиз анилидов
«Некатализируемый» ($\beta = 0, \alpha = 10$) 	Гидролиз кеталей и ацеталей	
ООК — ОКК 		Ортоэфиры (большой α)

	Карбонильные производные	Ацильные производные
1. >C=O <i>Некатализируемый</i> $\text{R}'\text{O}^- \curvearrowright \text{C} \begin{array}{l} \text{R} \\ \text{O}^+ \\ \parallel \end{array} \rightleftharpoons \text{R}'\text{O}-\text{C} \begin{array}{l} \text{R} \\ \text{O} \\ \parallel \end{array} \text{---}$	$\text{R}'\text{O}^- = \text{карбоксилат}$	
<i>ОКК (кинетически ООК)</i> $\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{A}^- \text{HN} \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C-O}^- \end{array} \text{---} \text{A-H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \quad \leftarrow \quad \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{N} \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{O}^- \\ \parallel \end{array} \text{---} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$		Гидролиз анилидов
2. >C=N-	Карбонильные производные	Ацильные производные
<i>Некатализируемый”</i> ($\alpha=1$ для свободного имина) $\text{X} \curvearrowright \text{>C=N}^+ \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{X}^+ \curvearrowright \text{C=N}^+ \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \end{array}$	Алкохолит- и гидроксил-ионы	Отщепление алкохолита в реакции имидоэфиров с основными аминами Атака амином — имидаты Атака ионом гидроксила — имидаты

2. >C=N-	Карбонильные производные	Ацильные производные
<i>Некатализируемый</i> $\text{X} \sim \text{>C} \equiv \text{N-}$ $\parallel$ $^+\text{X} \sim \text{C} \equiv \text{N-}$	Имины и VN_4^- (вероятно) $\text{OH}^- +$ бензильденанилины, оксимы (?)	
<i>ОКК-ОКК</i> $\text{X} \sim \text{>C} \equiv \text{N} \sim \text{H-A}$ $\parallel$ $^+\text{X} \sim \text{C} \equiv \text{N} \sim \text{H-A}$	Тиосемикарбазоны	
<i>ОКК-ОКК</i> $\text{A} \sim \text{H} \sim \text{X} \sim \text{>C} \equiv \text{N} \sim$ $\parallel$ $\text{A-H} \sim \text{X} \sim \text{C} \equiv \text{N} \sim$	RON Амины (?)	Отщепление спирта в реакции имидазифиров со слабососновными аминами $\text{RON} \rightarrow$ амидиниевые ионы $\text{RON} \rightarrow$ имидазы

ЛИТЕРАТУРА

1. Бендер М. Л., Механизмы катализа нуклеофильных реакций производных карбоновых кислот, «Мир», М., 1964. Jencks W. P., Progr. Phys. Org. Chem., 2, 63 (1964); Брюс Т., Бенкович С., Механизмы биорганических реакций, «Мир», М., 1970; Martin R. B., J. Phys. Chem., 68, 1369 (1964); Johnson S., Adv. Phys. Org. Chem., 5, 237 (1967).
2. Bell R. P., Advan. Phys. Org. Chem., 4, 1 (1966).
3. Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 75, 5986 (1953).
4. Zaugg H. E., Papendick V., Michaels R. J., J. Am. Chem. Soc., 86, 1399 (1964).
5. Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 81, 475 (1959).
6. Ross S. D., Kuntz I., J. Am. Chem. Soc., 76, 3000 (1954).
7. Ingri N., Acta Chem. Scand., 17, 573 (1963).
8. Hand E., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 3505 (1962).
9. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 4319 (1962).
10. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Am. Chem. Soc., 86, 5616 (1964).
11. Anderson B. M., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 82, 1773 (1960).
12. Kirsch J. F., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 86, 837 (1964).
13. Schmir G. L., Cunningham B. A., J. Am. Chem. Soc., 87, 5692 (1964); Cunningham B. A., Schmir G. L., ibid., 88, 551 (1966).
14. Fernley H. N., Walker P. G., Nature, 212, 1435 (1966); Aldridge W. N., Barman T. E., Gutfreund H., Biochem. J., 92, 23C (1964).
15. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 85, 2843 (1963).
16. Reimann J. E., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 88, 3973 (1966).
17. Do Amaral L., Sandstrom W. A., Cordes E. H., J. Am. Chem. Soc., 88, 2225 (1966).
18. Koehler K., Sandstrom W., Cordes E. H., J. Am. Chem. Soc., 86, 2413 (1964).
19. Williams A., Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 88, 2508 (1966).
20. Masui M., Yijima C., J. Chem. Soc., 1966 B, 56.
21. Bender M. L., Reinstein J. A., Silver M. S., Mikulak R., J. Am. Chem. Soc., 87, 4545 (1965).
22. Barrett E., Lapworth A., J. Chem. Soc., 93, 85 (1908).
23. Martin R. B., J. Phys. Chem., 68, 1369 (1964).
24. Willi A. V., Helv. Chim. Acta, 39, 1193 (1956).
25. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 832 (1962).
26. Reeves R. L., J. Am. Chem. Soc., 84, 3332 (1962).
27. Willi A. V., Robertson R. E., Can. J. Chem., 31, 361 (1953).
28. Nordhoy F., Ugelstad J., Acta Chem. Scand., 13, 864 (1959).
29. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 832 (1962).
30. Kastening B., Holleck L., Melkonian G. A., Z. Electrochem., 60, 130 (1956).
31. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 4319 (1962).
32. Ogata Y., Kawasaki A., Okumura N., Tetrahedron, 22, 1731 (1966).
33. Crowe G. A., Jr., Lynch C. C., J. Am. Chem. Soc., 71, 3731 (1949); Koskikallio J., Acta Chem. Scand., 10, 1267 (1956); Ugelstad J., De Jonge J., Rec. Trav. Chim., 76, 919 (1957); Dušek K., Collection Czech. Commun., 25, 108 (1960); De Jonge J., Rec. Trav. Chim., 71, 643 (1952); Imoto M., Kobayashi M., Bull. Chem. Soc. Japan, 33, 1651 (1960).
34. Meadows G. W., de B. Darwent B., Trans. Faraday Soc., 48, 1015 (1952); Bell R. P., Baughan E. C., J. Chem. Soc., 1937, 1947.
35. Sander E. G., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 90, 4377 (1968).
36. Jencks W. P., Progr. Phys. Org. Chem., 2, 63 (1964).
37. Cordes E. H., Progr. Phys. Org. Chem., 4, 1 (1967).
38. Salomaa P., Acta Chem. Scand., 19, 1663 (1965).
39. Jencks W. P., Brookhaven Symp. Biol., 15, 134 (1962).
40. Lienhard G. E., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 88, 3982 (1966).
41. Barnett R., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 89, 5963 (1967).
42. Lapworth A., J. Chem. Soc., 83, 995 (1903); Svirbely W. J., Roth J. F., J. Am. Chem. Soc., 75, 3106 (1953).
43. Noyce D. S., Reed W. L., J. Am. Chem. Soc., 81, 624 (1959); Noyce D. S., Snyder L. R., ibid., p. 620; Noyce D. S., Pryor W. A., ibid., p. 618.
44. Stiles M., Wolf D., Hudson G. V., J. Am. Chem. Soc., 81, 628 (1959).
45. Winstein S., Lucas H. J., J. Am. Chem. Soc., 59, 1461 (1937).
46. Noyce D. S., Jorgenson M. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 2525 (1961).
47. Crowell T. I., Helsley G. C., Lutz R. E., Scott W. L., J. Am. Chem. Soc., 85, 443 (1963).
48. Patai S., Rappoport Z., J. Chem. Soc., 1962, 396.
49. Stewart R., J. Am. Chem. Soc., 74, 4531 (1952).
50. Crowell T. I., Francis A. W., Jr., J. Am. Chem. Soc., 83, 591 (1961); Crowell T. I., Kim T. R., Doctoral Dissertation, University of Virginia, Charlottesville, Va., 1965.
51. Dawson B. E., Henshall T., J. Phys. Chem., 67, 1187 (1963).

52. Cordes E. H., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 826 (1962).
53. Stewart T. D., Li C-H., J. Am. Chem. Soc., 80, 2782 (1938).
54. Alexander E. R., Underhill E. J., J. Am. Chem. Soc., 71, 4014 (1949).
55. Cummings T. F., Shelton J. R., J. Org. Chem., 25, 419 (1960).
56. Hellmann H., Opitz G., Ber., 89, 81 (1956).
57. Bender M. L., J. Am. Chem. Soc., 73, 1626 (1951); Chem. Rev., 60, 53 (1960).
58. Bunton C. A., Ann. Rep. Soc., 55, 186 (1958).
59. Jordan R. B., Taube H., J. Am. Chem. Soc., 88, 4406 (1966).
60. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Am. Chem. Soc., 90, 2622 (1968).
61. Oakenfull D. G., Riley T., Gold V., Chem. Comm., 1966, 385; Gold V., Oakenfull D. G., Riley T., J. Chem. Soc., 1968 B, 515.
62. Kilpatrick M., Jr., J. Am. Chem. Soc., 50, 2891 (1928).
63. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Am. Chem. Soc., 83, 1743 (1961).
64. Koskikallio J., Pouli D., Whalley E., Can. J. Chem., 37, 1360 (1959); DiSabato G., Jencks W. P., Whalley E., ibid., 40, 1220 (1962).
65. Bender M. L., Pollock E. J., Neveu M. C., J. Am. Chem. Soc., 84, 595 (1962).
66. Johnson S., Advan. Phys. Org. Chem., 5, 237 (1967).
67. Marburg S., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 232 (1962).
68. Bunton C. A., Fuller N. A., Perry S. G., Pitman I. H., J. Chem. Soc., 1962, 4478.
69. Bender M. L., d'A Heck H., J. Am. Chem. Soc., 89, 1211 (1967).
70. Johnson S. L., J. Am. Chem. Soc., 86, 3819 (1964).
71. Bender M. L., Ginger R. D., Unik J. P., J. Am. Chem. Soc., 80, 1044 (1958).
72. Hine J., Bayer R. P., J. Am. Chem. Soc., 84, 1989 (1962).
73. Brønsted J. N., Wynne-Jones W. F. K., Trans. Faraday Soc., 25, 59 (1929).
74. Hinshelwood C. N., Legard A. R., J. Chem. Soc., 1935, 587.
75. Bunton C. A., Spatcher D. N., J. Chem. Soc., 1956, 1079.
76. Jencks W. P., Cordes S., Carriuolo J., J. Biol. Chem., 235, 3608 (1960).
77. Baker A. W., Harris G. H., J. Am. Chem. Soc., 82, 1923 (1960).
78. Fedor L. R., Bruice T. C., J. Am. Chem. Soc., 87, 4138 (1965).
79. Paul M. A., Long F. A., Chem. Rev., 57, 1 (1957).
80. Martin R. B., Hedrick R. I., J. Am. Chem. Soc., 4, 106 (1962).
81. Biechler S. S., Taft R. W., Jr., J. Am. Chem. Soc., 79, 4927 (1957).
82. Behme M. T., Cordes E. H., J. Org. Chem., 29, 1255 (1964).
83. Mader P. M., J. Am. Chem. Soc., 87, 3191 (1965).
84. Schowen R. L., Jayaraman H., Kershner L., J. Am. Chem. Soc., 88, 3373 (1966).
85. Eriksson S. O., Holst C., Acta Chem. Scand., 20 1892 (1966); Eriksson S. O., Bratt L. ibid., 21, 1812 (1967).
86. Dolman D., Stewart R., Can. J. Chem., 45, 911 (1967).
87. Bender M. L., Thomas R. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 4183 (1961).
88. Bunton C. A., Nayak B., O'Connor C., J. Org. Chem., 33, 572 (1968).
89. Cunningham B. A., Schmir G. L., J. Am. Chem. Soc., 89, 917 (1967).
90. Hansen B., Acta Chem. Scand., 17, 1307 (1963).
91. Blackburn, G. M., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 90, 2638 (1968).
92. Pinner Ae, Die Imidoäther und ihre Derivate, Berlin, 1892; Roger R., Neilson D. G., Chem. R v., 61, 179 (1961).
93. Elliott D' F., Biochem. J., 45, 429 (1949); Brown I., Edwards O. E., Can. J. Chem., 43, 1266 (1965); Berlin K. D., Khayat M. A. R., Tetrahedron, 22, 975 (1966).
94. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Am. Chem. Soc., 82, 675 (1960).
95. Bruice T. C., Donzel A., Huffman R. W., Butler A. R., J. Am. Chem. Soc., 89, 2106 (1967).
96. Kandel M., Cordes E. H., J. Org. Chem., 32, 3061 (1967).
97. Oxley P., Short W. F., J. Chem. Soc., 1948, 1514.
98. Bruice T. C., Lapinski R., J. Am. Chem. Soc., 80, 2265 (1958).
99. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Am. Chem. Soc., 82, 1778 (1960).
100. Connors K. A., Bender M. L., J. Org. Chem., 26, 2498 (1961).
101. Chaturvedi R. K., MacMahon A. E., Schmir G. L., J. Am. Chem. Soc., 89, 6984 (1967).
102. Burnett J. F., Davis G. T., J. Am. Chem. Soc., 82, 665 (1960).
103. Bruice T. L., Mayahi M. F., J. Am. Chem. Soc., 82, 3067 (1960).
104. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Am. Chem. Soc., 88, 104 (1966).
105. Do Amaral L., Koehler K., Bartenbach D., Pletcher T., Cordes E. H., J. Am. Chem. Soc., 89, 3537 (1967).
106. Bruice T. C., Benkovic S. J., J. Am. Chem. Soc., 86, 418 (1964).
107. Jencks W. P., Carriuolo J., J. Biol. Chem., 234, 1272, 1280 (1959).
108. Martin R. B., Hedrick R. I., J. Am. Chem. Soc., 84, 106 (1962).
109. Martin R. B., Hedrick R. I., Parcell A., J. Org. Chem., 29, 3197 (1964).
110. Bruice T. C., Fedor L. R., J. Am. Chem. Soc., 86, 4886 (1964).
111. Overbeek J. Th. G., Koningsberger V. V., Proc. Koninkl. Nedl. Akad. Wetenschap. (Amsterdam), B 57, 311 (1954).
112. Bruice T. C., Bruno J. J., Chou W-S., J. Am. Chem. Soc., 85, 1659 (1963).
113. Fedor L. R., Bruice T. C., J. Am. Chem. Soc., 86, 4117 (1964).

114. *Roger R., Neilson D. G.*, Chem. Rev., **61**, 179 (1961); *Hurd R. N., DeLamater G.*, *ibid.*, p. 45.
115. *Martin R. B., Lowey S., Elson E. L., Edsall J. T.*, J. Am. Chem. Soc., **81**, 5089 (1959).
116. *Barnett R., Jencks W. P.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 4199 (1968).
117. *Eigen M.*, Angew. Chem. Intern. Ed., **3**, 1 (1964).
118. *Robinson D. R., Jencks W. P.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 7088, 7098 (1967).
119. *Lienhard G. E., Jencks W. P.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 3855 (1965).
120. *Hibbert F., Satchell D. P. N.*, J. Chem. Soc., **1967 B**, 653.
121. *Lienhard G. E.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 5642 (1966).
122. *Pearson R. G., Mayerle E. A.*, J. Am. Chem. Soc., **73**, 926 (1951).
123. *Bunnett J. F., Miles J. H., Nahabedian K. V.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 2512 (1961).
124. *Pfeil E., Stache H., Lömker F.*, Ann. Chem., **623**, 74 (1959).
125. *Pearson R. G., Anderson D. H., Alt L. L.*, J. Am. Chem. Soc., **77**, 527 (1955); *Cook E. H., Taft R. W., Jr.*, *ibid.*, **74**, 6103 (1952).
126. *Lienhard G. E., Jencks W. P.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 3863 (1965).

ПРАКТИЧЕСКАЯ КИНЕТИКА

Химическую кинетику можно рассматривать либо как самостоятельную науку, либо как инструмент изучения механизмов реакций. Цель настоящей главы — описание элементарных кинетических методов и интерпретаций, полезных при исследовании механизма реакции. Автор разделяет здоровое недоверие многих к доказательствам механизма реакции, основанное на сложных кинетических уравнениях, которые трудно понять как отражение наблюдаемого поведения реакции. Фактически автор следовал правилу не принимать до конца кинетическое доказательство предложенного механизма реакции до тех пор, пока он не сможет понять механистического значения данного типа кинетического поведения или уравнения интуитивным, не математическим способом. Следствием использования такого подхода в течение многих лет явилось то, что некоторые кинетические свидетельства механизмов реакции не принимались так быстро, как они того заслуживали, однако ко много большому числу механизмов автор справедливо относился с недоверием, поскольку они не отвечали этому критерию и в дальнейшем было показано, что они не верны.

Для начинающего в этой области экспериментатора невозможно переоценить то положение, что получение и изучение кинетических данных должны проводиться таким образом, чтобы экспериментальное проявление той или иной кинетической закономерности было очевидным и максимальным по величине. Так, если желательно продемонстрировать существование какого-нибудь кинетического члена в реакции, необходимо условия эксперимента выбрать так, чтобы при изменении изучаемой переменной наблюдалось по крайней мере 50%-ное изменение скорости. Нагляднее всего кинетические данные представлять в форме функциональных зависимостей неисправленных экспериментальных констант скоростей от переменных параметров наряду с теоретически вычисленными кривыми, которые можно было ожидать в присутствии и в отсутствие изучаемого эффекта.

При использовании кинетических методов для изучения механизма реакции обычно полезнее получить пять значений константы скорости с точностью $\pm 5\%$, чем одно значение с точностью $\pm 1\%$. Экспериментальные данные, полученные в широком диапазоне условий реакции, позволяют четко продемонстрировать влияние изучаемой переменной на скорость реакции и часто обнаруживают некоторые неожиданные эффекты, которые ведут к более важным выводам, чем те, ради которых ставился эксперимент.

Содержание этой главы покажется элементарным профессиональному кинетику (каковым автор не является), однако оно обеспечивает достаточные основы для понимания и использования кинетических методов в исследовании механизмов большого числа реакций, происходящих в водном растворе. Для более детального ознакомления с экспериментальным и теоретическим рассмотрением кинетики реакций читатель отсылается к соответствующим монографиям [1].

А. СКОРОСТИ, КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ И ПОРЯДОК РЕАКЦИИ

В простейшем случае скорость реакции двух молекул А и В с образованием продукта Р в растворе (схема 1) пропорциональна числу взаимных соударений двух молекул и, следовательно, пропорциональна концентрации каждого реагента:



Эта закономерность описывается уравнением (2), в котором константа скорости реакции второго порядка является коэффициентом пропорциональности перед произведением концентраций двух реагирующих молекул:

$$\text{скорость} = v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B]. \quad (2)$$

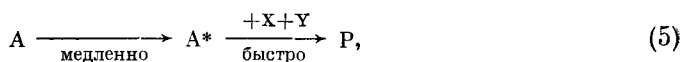
Если концентрации реагентов выражаются в молярной шкале, размерность этой константы скорости будет л/моль·время. Скорость реакции первого порядка [схема (3)]



пропорциональна концентрации одного вещества и описывается константой скорости реакции первого порядка, которая имеет размерность обратного времени с⁻¹ или мин⁻¹ [уравнение (4)]:

$$v = k[A]. \quad (4)$$

Таким образом, порядок реакции описывает число молекул, которым пропорциональна скорость реакции; однако он не обязательно указывает на число молекул, вовлекаемых в реакцию, поскольку некоторые молекулы могут реагировать, не влияя на наблюдаемую скорость реакции [схема (5), уравнение (6)]. В таких случаях говорят, что реакция является реакцией нулевого порядка относительно такого реагента



$$v = k[A]. \quad (6)$$

1. РЕАКЦИИ ПЕРВОГО ПОРЯДКА

Уравнение (4) для реакции первого порядка можно проинтегрировать от t_0 до экспериментально определяемого времени в соответствии с уравнениями (7) — (10), в которых A_0 — концентрация компонента А в нулевое время:

$$\int_{A_0}^A -\frac{d[A]}{[A]} = k \int_{t_0}^t dt, \quad (7)$$

$$-\ln[A] + \ln A_0 = kt, \quad (8)$$

$$\ln \frac{A_0}{[A]} = kt, \quad (9)$$

$$[A] = A_0 e^{-kt}. \quad (10)$$

Переменными в этих уравнениях являются $[A]$ и t , так что концентрация А экспоненциально уменьшается во времени и зависимость $\log [A]$ от t линейна с тангенсом угла наклона, равным $-k/2,303$ (рис. 1). Время полупревращения реакции есть время, в течение которого концентрация А уменьшается наполовину по сравнению с начальным значением. Подстановка $0,5 A_0$ в уравнение (9) приводит к уравнению (11), которое показывает, что время

полупревращения в реакции первого порядка непосредственно связано с кон-

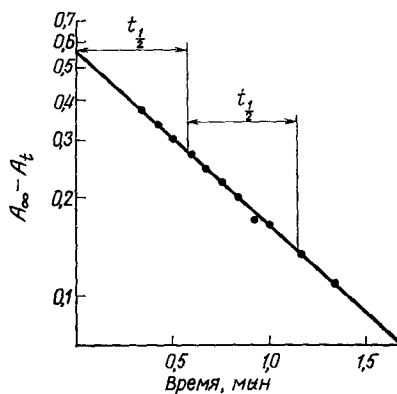
$$\ln \frac{A_0}{0,5A_0} = kt_{1/2} = \ln 2 = 0,693, \quad (11)$$

стантой скорости первого порядка; это соотношение представлено уравнением

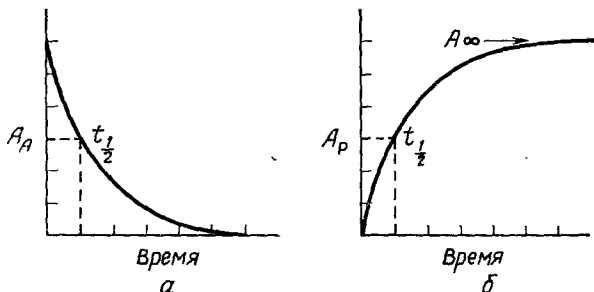
$$k = \frac{0,693}{t_{1/2}}. \quad (12)$$

На практике удобно откладывать $[A]$ или некоторую экспериментально определяемую величину, прямо пропорциональную $[A]$, в полулогарифмических координатах как функцию времени. Время полупревращения можно непосредственно определить из этой зависимости как время, в течение которого концентрация A уменьшится наполовину по сравнению со своим начальным значением. Затем по уравнению (12) можно определить константу скорости первого порядка. Поскольку время полупревращения реакции не зависит от концентрации A , оно может быть определено из любой части этой прямой, и, чтобы избежать ошибок, важно проверить время полупревращения по крайней мере еще для одного дополнительного периода реакции (рис. 1).

Одним из величайших практических удобств реакций первого порядка является то, что их кинетическое поведение не зависит от концентрации реагирующих веществ, так что константа скорости может быть получена из времени полупревращения для наблюдаемого исчезновения реагирующих веществ или появления продуктов реакции без знания их абсолютной концентрации. Таким образом, вместо построения зависимости $\log [A]$ от времени можно использовать результаты любого другого экспериментального измерения, которое пропорционально концентрации A (или P). Это очевидно, если, например, кривые изменения оптической плотности вещества A или продукта P , который образуется из A , изучены в отсутствие перекрывающего поглощения другой частицы (рис. 2, а и 2, б). Это менее очевидно, если



Р и с. 1. Зависимость (полулогарифмические координаты) изменений в поглощении при 270 нм, вызываемых выделением фенола и фенолят-иона в реакции $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л фенилацетата с 0,6 моль/л буферным раствором этиламина, содержащим 40% свободного основания при ионной силе 1,0 моль/л раствора хлорида калия и 5 °С. Реакция подчиняется кинетике (псевдо)первого порядка с временем полупревращения, которое не зависит от глубины реакции.



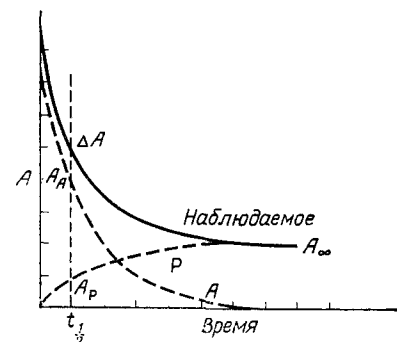
Р и с. 2. Зависимость поглощения реагента A_A или продукта A_P от времени для реакции первого порядка в случае, если только продукт или только реагент поглощают на длине волны, выбранной для экспериментального измерения.

измерения проводят на длинах волн, на которых меняется поглощение как A , так и P (рис. 3), тем не менее это справедливо и в данном случае. То, что время полупревращения, измеренное по изменению оптической плотности $0,5 \Delta A$, является одинаковым как для исчезновения A , так и для появления P , видно из того факта, что наблюдаемая оптическая плотность при времени

протекания реакции, равно времени полупревращения, равна поглощению половины начальной концентрации A ($0,5 A_0$) плюс поглощение половины конечной концентрации P ($0,5 P_\infty$), как показано уравнением

$$\begin{aligned} 0,5 \Delta A_{\text{tot}} &= A_0 \epsilon_A - 0,5 A_0 \epsilon_A + 0,5 P_\infty \epsilon_P = \\ &= 0,5 A_0 \epsilon_A + 0,5 P_\infty \epsilon_P, \end{aligned} \quad (13)$$

в котором ϵ_A и ϵ_P — молярные коэффициенты экстинкции A и P соответственно. Таким образом, протекание реакции первого порядка можно исследовать при измерении полупериодов изменений в видимом, ультрафиолетовом, инфракрасном, ядерном магнитном резонансном поглощении, так же как при изменении полупериодов изменений объема, электропроводности, выделения тепла, оптического вращения, показателя преломления, концентрации ионов водорода, поскольку полупериоды изменений этих величин являются теми же, что и для изменений концент-



Р и с. 3. Наблюдаемое изменение в поглощении и изменения в поглощении исходного соединения и продукта реакции, в случае если оба соединения поглощают на выбранной длине волн. Время полупревращения для всех изменений поглощения одинаково.

раций A и P . Конечно, это будет справедливо лишь в том случае, если измеряемые величины линейно связаны с концентрациями A , P или A и P .

Практически, если поглощение (или другая измеряемая величина) возрастает в течение эксперимента, в полулогарифмических координатах откладывают величину $A_\infty - A_t$ от времени протекания реакции. Если поглощение уменьшается, откладывают величину $A_t - A_\infty$. Важно быть уверенным, что в течение эксперимента на изменение поглощения не влияют другие факторы, за исключением изменения концентраций реагирующих веществ.

2. ЗАВЕРШЕНИЕ РЕАКЦИИ

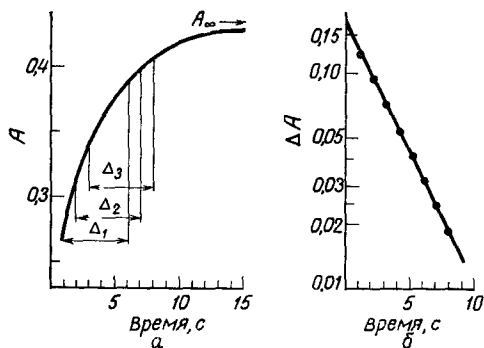
Наиболее важной экспериментальной величиной, которая требуется для определения констант скоростей первого порядка, является предельное значение поглощения или другого исследуемого параметра A_∞ , которое соответствует концу реакции, поскольку каждое экспериментальное значение A_t должно вычитаться из этого значения, или наоборот. Наиболее часто причиной, вызывающей отклонение от кинетики первого порядка в реакциях, для которых ожидается первый порядок, является ошибка в определении конечных значений. Экспериментальные значения, соответствующие концу реакций, обнаруживают значительно меньшие абсолютные изменения, чем в начальные моменты, и особенно чувствительны к ошибкам и отклонениям, вызываемым неправильным определением конечной точки и предельного значения. Случайные экспериментальные ошибки обычно приводят к разбросу точек, в то время как неправильное определение предельного значения (систематическая ошибка) ведет к искривлению прямой линии вблизи окончания реакции.

Предельные значения обычно определяют после протекания отрезка времени, соответствующего 10 периодам полупревращения, когда реакция

протекает до завершения на 99,9%. В некоторых случаях определение времени полупревращения и предельного значения можно провести при семи временах полупревращения; в этом случае реакция достигает глубины 99,2% и необходимо сделать поправку на 0,8% к найденному значению. Иногда необходимо установить предельное значение из наблюдений при более ранних временах путем внесения соответствующей поправки. Однако в этом случае важно быть уверенным, что реакция протекает по первому порядку. Доля непревращенного вещества, остающегося после времени реакции, которое соответствует различному числу периодов полупревращения, приведена справа:

Число периодов полупревращения	Доля непревращенного вещества, %
4	6,25
5	3,1
6	1,5
7	0,8

Ошибки в определении предельного значения часто возникают вследствие вторичных процессов, например окисления продуктов реакции, которые вызывают изменения поглощения или другого исследуемого параметра. Иногда полезно найти предельное значение, используя реакционную смесь, в которой протекает реакция того же количества субстрата, но протекает



Р и с. 4. Приложение метода Гугенгейма для реакции катиона 1-ацетокси-4-метокси-пиридиния с этилендиамином ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) в 0,01 моль/л боратного буфера при pH 8,36, ионной силе 1,0 моль/л и 25°C. Исследование проводили спектрофотометрически при 280 нм.

а — наблюдаемое изменение поглощения от времени; б — полулогарифмическая прямая изменения поглощения через интервал в 5 с.

применяемый в том случае, если трудно найти предельное значение, был описан Гугенгеймом [2]. Если значение x_{∞} измеряемого параметра в конце реакции не известно, можно взять значение параметра при серии времен t и при серии времен, отстоящих на постоянную величину $t + \Delta$ (рис. 4). Чтобы получить более точное значение константы, измерения нужно проводить в области времени полупревращения реакции. Значение параметра при каждом времени x_t для реакции первого порядка выражается уравнением (14), значение при времени $t + \Delta$ — аналогичным уравнением (15)

$$x_t - x_{\infty} = (x_0 - x_{\infty}) e^{-kt}, \quad (14)$$

$$x_{t+\Delta} - x_{\infty} = (x_0 - x_{\infty}) e^{-k(t+\Delta)}. \quad (15)$$

Вычитание этих уравнений приводит к уравнению

$$x_t - x_{t+\Delta} = (x_0 - x_{\infty}) e^{-kt} (1 + e^{-k\Delta}), \quad (16)$$

достаточно быстро, чтобы можно было пренебречь вторичными процессами. Это можно сделать добавлением большей концентрации второго реагента, при введении поправки на поглощение этого реагента или определением предельного значения в модельной реакционной смеси. Так, предельное значение поглощения для медленной реакции фенилового эфира с амином (которую спектрофотометрически исследуют по выделению фенола) можно получить, подвергая известное количество достаточно концентрированного раствора фенилацетата щелочному гидролизу, нейтрализуя его и затем добавляя к модельной реакционной смеси, содержащей амин, с получением той же конечной концентрации фенола, как и в кинетическом эксперименте.

Альтернативный метод получения константы скорости первого порядка,

логарифмическая форма которого дана уравнением

$$\ln(x_t - x_\Delta) = -kt + \ln[(x_0 - x_\infty)(1 - e^{-k\Delta})]. \quad (17)$$

Последний член уравнения (17), который содержит неизвестную величину x_∞ , является постоянным и не используется при определении константы скорости реакции. Константу скорости определяют обычным способом из графика $\log(x_t - x_\Delta)$ или $\log(x_\Delta - x_t)$ от времени (рис. 4). Опасность этого метода заключается в том, что он может приводить к линейным зависимостям для реакций, которые не подчиняются строго кинетике первого порядка. Прежде чем использовать этот метод, необходимо убедиться, что реакция подчиняется кинетике первого порядка и что вторичные процессы не влияют на значение параметра при $t + \Delta$.

Достаточным свидетельством в пользу того, что реакция строго описывается кинетическими уравнениями первого порядка, является демонстрация справедливости уравнения при временах реакции до трех-четырех периодов полупревращения. Точные значения констант скоростей можно получать при исследовании реакции в течение двух периодов полупревращения, если достаточно точно определено предельное значение. В некоторых случаях достаточную точность определения константы скорости можно получить и при изучении реакции в течение одного периода полупревращения, если точно установлено, что реакция подчиняется кинетике первого порядка. Однако отклонения от кинетики первого порядка вследствие неправильного определения предельного значения или по каким-либо другим причинам могут не проявиться при исследовании реакции в течение одного или даже двух периодов полупревращения, так что, если не установлено, что реакция строго подчиняется кинетике первого порядка, значения констант скоростей могут получиться с большой ошибкой.

3. РЕАКЦИИ ВТОРОГО ПОРЯДКА

Для реакции второго порядка [схема (1)], которая подчиняется уравнению скорости (2), интегрирование последнего приводит к

$$\frac{1}{B_0 - A_0} \ln \frac{A_0(B_0 - x)}{B_0(A_0 - x)} = kt, \quad (18)$$

в котором A_0 и B_0 — начальные концентрации веществ А и В, x — убыль концентраций А и В, и равно концентрации образовавшегося продукта. Константу скорости реакции k можно определить из зависимости $\ln[(B_0 - x)/(A_0 - x)]$ от времени.

В специальном случае, когда концентрации А и В в нулевое время равны ($A_0 = B_0$), уравнение для скорости реакции и его интеграл имеют вид уравнений (19) и (20), в которых C соответствует остающимся концентрациям А или В. Константу скорости k можно получить из зависимости $1/C$ от времени

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2, \quad (19)$$

$$\frac{1}{C} - \frac{1}{C_0} = kt. \quad (20)$$

В случае если концентрация А много больше, чем концентрация В, концентрация А заметно не меняется в течение реакции, и ее можно считать постоянной. Уравнение скорости для этого случая дается уравнением

$$v = k[A](B_0 - x) = k_{\text{obs}}(B_0 - x), \quad (21)$$

в котором константа скорости первого порядка равна $k[A]$. О такой реакции говорят, что она является реакцией псевдопервого порядка, поскольку каж-

дая экспериментальная кривая подчиняется уравнению первого порядка, однако наблюдаемая константа скорости k_{obs} не является действительной константой, а представляет собой функцию от концентрации второго реагента А. Константу скорости второго порядка определяют из наклона зависимости k_{obs} , измеренной при различных концентрациях А, от [А]. Константы скорости псевдопервого порядка дают удобный метод кинетического изучения механизма реакции, однако большая опасность использования таких констант заключается в их чувствительности к примесям, которые могут присутствовать в низких концентрациях в реагенте А, находящемся в большом избытке. Если такие загрязнения много более реакционноспособны, чем А, наблюдаемая реакция псевдопервого порядка может отражать реакцию с примесями, а не с А. Так, пиперидин получают восстановлением пиридина, и остающаяся при перегонке примесь 0,1% пиридина является ответственной за большинство наблюдаемых реакций раствора перегнанного пиперидина с активными ацилирующими агентами при pH 6 [3]. Это загрязнение, а также другие загрязнения аминов, такие, как метилзамещенные пиридины, можно удалить многократной перекристаллизацией гидрохлорида амина.

4. НАЧАЛЬНЫЕ СКОРОСТИ

Измерение начальных скоростей реакции является особенно полезным для получения констант скоростей медленных реакций. Упрощающее приближение этого метода заключается в том, что, если реакция протекает только на 1—2%, концентрации всех реагирующих веществ остаются в период измерения постоянными, так что константу скорости можно определить при известных концентрациях реагирующих веществ непосредственно из скорости появления продуктов; для реакции второго порядка это показано уравнением

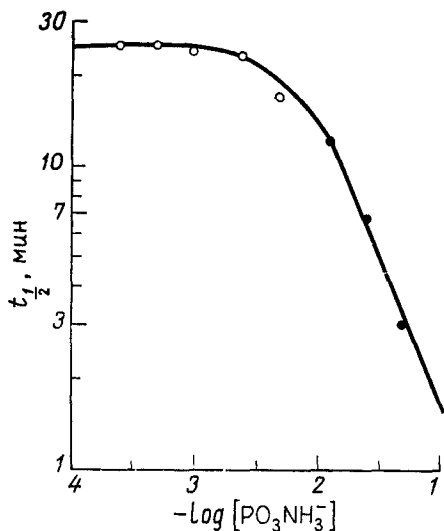
$$\frac{dP}{dt} = k [A] [B] \approx kA_0B_0. \quad (22)$$

Необходимым экспериментальным требованием для применения этого подхода является возможность определения малых количеств продукта реакции в присутствии большого избытка исходных веществ. Концентрацию исходных реагентов обычно определяют или весовым способом, или используя аналитическое определение концентраций в каждой реакционной смеси. В опытах, проводимых с использованием спектрофотометрического метода, часто бывает удобно определять концентрацию реагента, который превращается в продукт, регистрируемый спектрофотометрически, доводя реакцию до конца в аликвотной части реакционной смеси и определяя поглощение после соответствующего разбавления. Так, концентрацию фенилацетата в реакционной смеси можно определить, проведя щелочной гидролиз эфира в аликвотной части реакционной смеси, нейтрализовав раствор и спектрофотометрически определив после соответствующего разбавления концентрацию фенола. Преимущество этого метода заключается в том, что он ведет к исключению ошибок, связанных с неопределенностью концентрации или коэффициента экстинкции этого компонента реакционной смеси.

Зависимость констант скорости, полученных при измерении начальных скоростей реакции, от концентрации различных реагентов легко можно изучить в экспериментах, в которых отдельно варьируются концентрации этих реагентов. Небольшие количества высокореакционноспособных примесей в реагирующих веществах также могут привести к ошибкам в кинетических измерениях по методу начальных скоростей, как и по методу псевдопервого порядка.

5. ПОРЯДОК РЕАКЦИИ

Порядок реакции обычно виден из формы кинетической кривой, полученной в данном эксперименте, или в случае реакции, изученной по начальным скоростям либо при помощи констант скоростей псевдопервого порядка,



Р и с. 5. Зависимость логарифма времени полупревращения от логарифма концентрации фосфорамидата для реакции гидролиза фосфорамидата, катализируемой формальдегидом при ионной силе 1,0 моль/л, рН 4,5 и 39 °С.

● скорости определяли автоматическим титрованием. ○ скорости определяли по измерению появления неорганического фосфата [4].

его концентрации и в конце концов уменьшается с тангенсом угла наклона в логарифмической зависимости (рис. 5), равным -1 . Это означает, что при высоких концентрациях амида в уравнении скорости реакции становится заметным член второго порядка. Согласно этой информации, простейшее выражение для скорости гидролиза амида фосфорной кислоты может иметь вид уравнения

$$-\frac{d[\text{PA}]}{dt} = k_1[\text{PA}] + k_2[\text{PA}]^2, \quad (23)$$

в котором наблюдаемые константы скорости k_1 и k_2 зависят от концентрации других реагентов.

Альтернативный метод определения порядка реакций вплоть до третьего основан на анализе зависимости t/f от t в соответствии с приближенным уравнением (24), в котором f представляет собой долю превращения реакции за время t :

$$\frac{t}{f} = \frac{1}{kA_0} + \frac{nt}{2}, \quad (24)$$

где n — порядок реакции, A_0 — начальная концентрация реагента, k — константа скорости реакции. Наклон такой прямой равен половине порядка реакции; константу скорости можно получить из пересечения прямой с осью ординат [5].

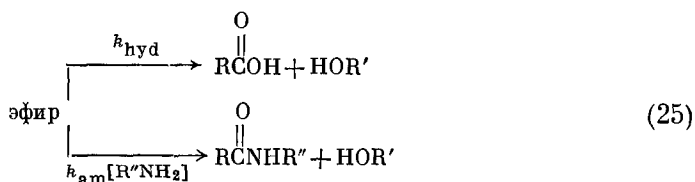
из зависимости константы скорости или скорости от концентрации реагентов. Альтернативный метод, который можно применить тогда, когда остальные критерии не дают ясного ответа, заключается в изучении порядка по каждому реагенту из зависимости времени полупревращения этого реагента от его начальной концентрации. Обычно можно определить время полупревращения для исчезновения данного реагента независимо от уравнения скорости, которым описывается его исчезновение. Далее строится логарифмическая зависимость измеренных периодов полупревращения от концентрации реагента, как это показано на рис. 5 для гидролиза амида фосфорной кислоты в присутствии формальдегида [4]. Порядок реакции равен отрицательному угловому коэффициенту полученной линии плюс 1,0. Время полупревращения гидролиза амида фосфорной кислоты не зависит от его концентрации при низких концентрациях, что характерно для реакции (псевдо)первого порядка. С увеличением концентрации амида время полупревращения начинает зависеть от

Б. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ ПСЕВДОПЕРВОГО ПОРЯДКА

По мнению автора, использование констант скоростей псевдопервого порядка, полученных в присутствии большого избытка всех реагентов, за исключением одного, концентрация которого меняется в растворе, обеспечивает наиболее полезный кинетический метод для установления механизма реакции. Во-первых, часто относительно легко можно получить серию констант скоростей псевдопервого порядка, исследуя исчезновение субстрата или появление продукта реакции при помощи спектрофотометрии или какого-нибудь другого относительно простого аналитического или физического метода. Во-вторых, в реакции первого порядка не обязательно знать точную концентрацию исчезающего реагента или появляющегося продукта реакции. Наконец, наиболее важным качеством таких констант скоростей является то, что они позволяют легко вскрыть влияние различных переменных на данную реакцию, что часто сделать трудно или даже невозможно, если реакция исследуется при использовании реагентов в близкой или равной концентрации. Некоторые пути, по которым это можно проделать, будут описаны в данном разделе.

1. ПАРАЛЛЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ПЕРВОГО ПОРЯДКА

Разделение констант скоростей в реакциях (псевдо)первого порядка становится возможным вследствие их аддитивности. Если субстрат исчезает более чем по одному конкурентному пути первого порядка, как в случае гидролиза и аминолита эфира в присутствии большого избытка амина [уравнение (25)], константы скорости реакций аддитивны [уравнения (26) и (27)] и константу скорости псевдопервого порядка для реакции аминолита $k'_{\text{ам}}$



$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[\text{R}'\text{OH}]}{dt} = k_{\text{hyd}} [\text{эфир}] + k_{\text{ам}} [\text{R}''\text{NH}_2] [\text{эфир}], = (k_{\text{hyd}} + k_{\text{ам}} [\text{R}''\text{NH}_2]) [\text{эфир}], \quad (26)$$

$$k_{\text{obs}} = \frac{v}{[\text{эфир}]} = k_{\text{hyd}} + k_{\text{ам}} [\text{R}''\text{NH}_2] = k_{\text{hyd}} + k'_{\text{ам}}. \quad (27)$$

можно определить, вычитая из наблюдаемой константы скорости константу скорости щелочного гидролиза, которую обычно можно измерить в отдельном эксперименте. Константу скорости второго порядка для аминолита можно получить, разделив константу скорости псевдопервого порядка для аминолита на концентрацию свободного амина и *полагая*, что реакция с амином протекает по первому порядку в отношении концентрации амина (т. е. общий порядок реакции является вторым). Обычно строят зависимость наблюдаемой константы первого порядка от концентрации второго реагента. Пересечение такой зависимости с осью ординат дает k_{hyd} , а наклон, если зависимость линейна, дает константу скорости второго порядка для аминолита (рис. 6).

Другой путь разделения компонент наблюдаемой константы скорости псевдопервого порядка заключается в определении соотношения продуктов в конце реакции. Поскольку все пути исчезновений субстрата — реакции первого порядка, доля субстрата, который прореагировал по каждому пути

в течение реакции, постоянна. Следовательно, отношение количеств продуктов в конце реакции равно отношению констант скорости псевдопервого порядка для путей реакции, приводящих к образованию продуктов. Таким образом, для конкурентного аминолита и гидролиза эфира отношение и абсолютные значения констант скорости гидролиза и аминолита можно получить из отношения амидного и кислотного продуктов реакции [уравнение (28)] и k_{obs} [уравнение (27)]

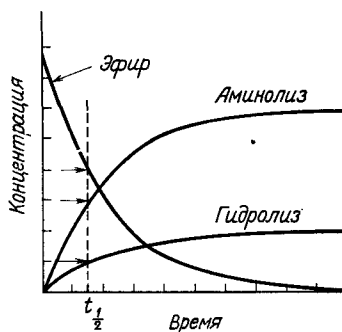
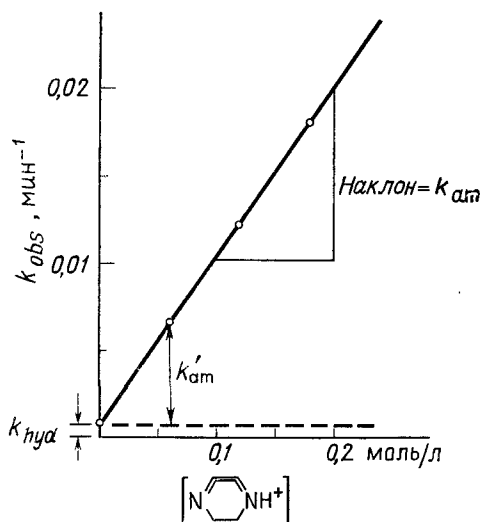
$$\frac{k_{\text{hyd}}}{k'_{\text{am}}} = \frac{[\text{RCOOH}]_{\text{final}}}{[\text{RCONHR}]_{\text{final}}} \quad (28)$$

Однако, чтобы применять этот метод, необходима уверенность, что реакции действительно протекают по предполагаемому механизму. Так, амин может вызывать исчезновение эфира не только вследствие реакции аминолита, но и вследствие общесосновного катализа гидролиза, так что не весь кинетический член, содержащий концентрацию амина, будет представлять аминолит. Практически определение продуктов и отношения их количеств чаще всего проводят для идентификации химической природы кинетического члена, т. е. для определения, представляет ли реакция с амином

Р и с. 6. Константы скорости псевдопервого порядка для реакции 2,4-динитрофенилацетата с монокационом триэтилендиамина в буфере, содержащем 60% монокациона и 40% дикациона при рН 3,57, ионной силе 1,0 моль/л хлорида калия и 25 °С.

аминолит, катализируемый амином гидролиз или как то, так и другое. При определении продуктов реакции, безусловно, надо быть уверенным, что в условиях эксперимента определяемый продукт остается стабильным.

Следует иметь в виду, что наблюдаемая константа скорости для реакции, которая протекает по нескольким конкурентным путям первого порядка, является одинаковой независимо от того, измеряется ли расход или образование какого-либо вещества. Так, для конкурентного гидролиза и аминолита эфира (рис. 7) время полупревращения является одинаковым для исчезновения эфира и для появления амида или кислоты (хотя абсолютные скорости в единицах моль/л·мин, безусловно, различны). Константу скорости псевдопервого порядка можно определить как из времени полупревращения небольшой доли реакции, которую представляет собой гидролиз, так и из любого другого измерения такого рода. Это может быть полезным при изучении реакций, которые не приводят к легко измеряемым изменениям в свойствах реагентов или продуктов. Если в систему ввести дополнительную реакцию, кинетику которой изучать легче, ее можно использовать как индикатор общей скорости исчезновения субстрата и, после поправки на известную скорость индикаторной реакции, как метод определения желаемой константы скорости.



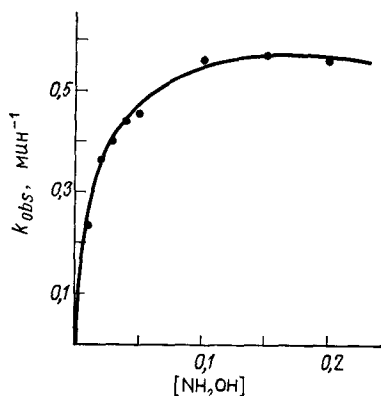
Р и с. 7. Исчезновение эфира и образование амида и кислоты для конкурентных аминолита и гидролиза эфира в зависимости от времени. Времена полупревращения расходования эфира и появления двух продуктов реакции одинаковы.

Причина идентичности времени полупревращения для различных конкурирующих реакций становится ясной из следующего рассуждения: когда прореагировала половина субстрата, должна образоваться половина максимального количества каждого продукта и абсолютная скорость каждой конкурентной реакции должна равняться половине начальной скорости (рис. 7).

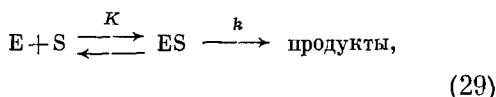
2. НЕЛИНЕЙНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ k_{obs} ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ДРУГОГО РЕАГЕНТА

В некоторых случаях зависимость наблюдаемой константы скорости псевдопервого порядка от концентрации реагента, присутствующего в большом избытке, нелинейна. Это значит, что реакция не является реакцией первого порядка относительно этого реагента и уравнение скорости имеет более сложный вид, чем это представлено уравнением (27). Такие отклонения часто дают наиболее интересную информацию о механизме реакции. Два возможных типа отклонений — отрицательные и положительные — имеют различную природу и рассматриваются порознь.

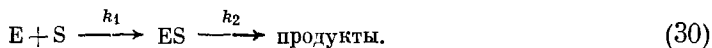
Отрицательное отклонение означает, что реакция протекает медленнее, чем можно было бы ожидать из зависимости скорости от концентрации реагента при его низких концентрациях. Это может быть следствием либо комплексообразования реагентов, либо изменения скорости определяющей стадии. Энзимологам знаком эффект «запределивания» скорости ферментативной реакции с увеличением концентрации субстрата, который может быть вызван либо образованием фермент-субстратного комплекса при высоких концентрациях субстрата [комплекс Михаэлиса, схема (29)], либо изменением



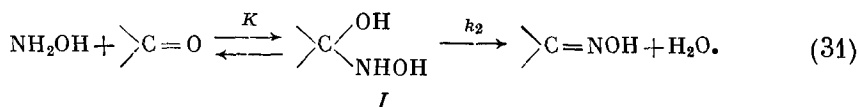
Р и с. 8. «Запределивание» скорости образования оксима из пирувата в присутствии избытка гидроксиламина, вызываемое полным превращением пирувата в продукт присоединения с гидроксиламином при pH 6,9, ионной силе 1,0 моль/л хлорида калия и 25 °C [6].



скорость определяющей стадии со стадии бимолекулярного образования комплекса на стадию мономолекулярного разложения комплекса [интерпретация Хелдена, схема (30)]. Пример образования комплекса в химической



реакции при синтезе оксима из гидроксиламина и пирувата приведен на рис. 8. В условиях проведения этой реакции (pH 6,9) скорость определяющей стадией является дегидратация продукта присоединения I, образование которого происходит на предшествующей быстрой равновесной стадии [схема (31)]



При низких концентрациях гидроксиламина очень незначительная доля пирувата связывается в промежуточный продукт присоединения, так что его концентрация и общая скорость реакции прямо пропорциональны концен-

трации гидроксилamina. При высокой концентрации гидроксилamina весь пируват превращается в продукт присоединения, и поэтому дальнейшее увеличение концентрации гидроксилamina не приводит к увеличению скорости, которая определяется скоростью разложения промежуточного соединения [6]. Наблюдаемая константа скорости при любой концентрации амина дается уравнением (32), которое выведено из предположения, что скорость реакции

$$k_{\text{obs}} = \frac{v}{[C=O]_{\text{tot}}} = k_2 [NH_2OH] \left(\frac{K}{1 + K [NH_2OH]} \right), \quad (32)$$

равна скорости разложения промежуточного соединения [уравнение (33)] при использовании константы равновесия для образования промежуточного соединения [уравнение (34)] и уравнения материального баланса для общей концентрации добавленного карбонильного соединения $[C=O]_{\text{tot}}$ [уравнение (35)]:

$$v = k_2 [I], \quad (33)$$

$$K = \frac{[I]}{[C=O] [NH_2OH]}, \quad (34)$$

$$[C=O]_{\text{tot}} = [C=O]_{\text{free}} + [I]. \quad (35)$$

Константу равновесия K можно определить из пересечения зависимости $1/k_{\text{obs}}$ от $1/[NH_2OH]$ с осью абсцисс подобно тому, как для ферментативных реакций в методе Лайнуивера — Берка *. Этот пример включает ковалентную ассоциацию реагирующих веществ, однако аналогичные зависимости будут наблюдаться при любом типе ассоциаций. Пиридины, например, образуют некоторые ассоциаты, в результате чего происходит уменьшение коэффициента активности вещества с увеличением концентрации, что приводит к нелинейным кинетическим зависимостям [7—9]. Пиридины и другие гидрофобные молекулы ассоциируют с эфирами и другими субстратами, что также приводит к нелинейным кинетическим соотношениям [3, 10, 11].

Если ассоциация реагентов отсутствует, то причиной отрицательного отклонения зависимости k_{obs} от концентрации реагента или катализатора является изменение скорости определяющей стадии реакции. Это удобный метод для доказательства наличия промежуточного соединения в механизме реакции. Некоторые примеры такого рода доказательств описаны в гл. 10.

Положительные отклонения на зависимостях констант скорости от концентраций (рис. 9) означают, что реакция протекает быстрее, чем этого можно было бы ожидать из кинетических данных при низкой концентрации, т. е. реакция имеет больший

Р и с. 9. Зависимость от концентрации буфера константы скорости псевдопервого порядка для реакции фенилацетата с буферным раствором метиламина, содержащим 40% свободного основания (при 5 °C, ионной силе 1,0, KCl), которая показывает, что зависимость константы скорости от концентрации метиламина имеет больший порядок, чем первый.

Верхняя кривая — реакция в воде, нижняя кривая — реакция в окиси дейтерия, k_0 — скорость гидролиза отсутствие амина [12].

порядок, чем первый, по отношению к концентрации варьируемого реагента, и в уравнение скорости необходимо добавить *дополнительный* член. Простейший способ для определения этого члена заключается в вычислении

* Этот метод нельзя использовать, если реагирующее вещество является катализатором второй стадии процесса, так как в этом случае константа скорости не достигает постоянного значения.

кажущейся константы скорости второго порядка k_{2app} делением каждой наблюдаемой константы скорости на концентрацию активных частиц реагента [уравнение (36)]:

$$k_{2app} = \frac{k_{obs} - k_0}{[RNH_2]} \quad (36)$$

Увеличение k_{2app} с увеличением концентрации амина в реакции аминоллиза эфира отражает катализ реакции второй молекулой амина. Затем откладывают зависимость k_{2app} от концентрации амина (рис. 10). Пересечение этой зависимости с осью ординат в соответствии с уравнением (37) дает константу

$$\frac{v}{[эфир]} = k_{obs} = k_{hyd} + k_1 [RNH_2] + k_{RNH_2} [RNH_2] [RNH_2] + k_{OH^-} [RNH_2] [OH^-] \quad (37)$$

скорости второго порядка для некатализируемого (или катализируемого растворителем) аминоллиза эфира. Наклон этой зависимости дает константу

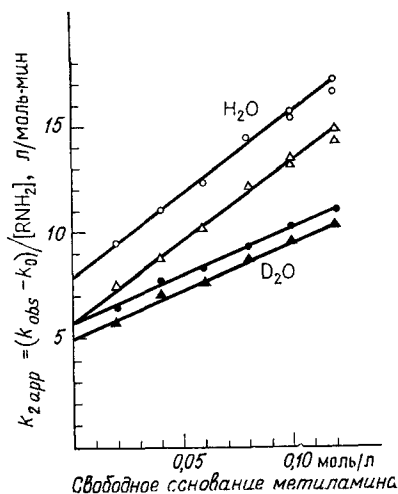


Рис. 10. Зависимость от концентрации метиламина кажущейся константы скорости второго порядка для реакции фенилацетата с метиламином в воде (○) и окиси дейтерия (●).
○ ● неисправленные константы скорости;
△ ▲ исправленные на катализ ионами гидроксила [12].

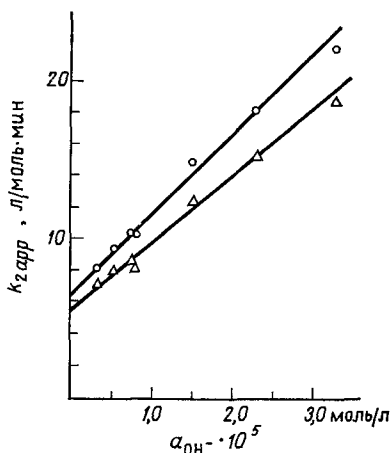


Рис. 11. Зависимость кажущейся константы скорости второго порядка $k_{2app} = (k_{obs} - k_0) / [RNH_2]$ от активности иона гидроксила для реакции метиламина с фенилацетатом при концентрации буфера 0,05 моль/л.
○ неисправленные значения; △ исправленные на катализ амином [12].

скорости третьего порядка k_{RNH_2} для реакции, катализируемой амином. Если отрезок на оси ординат равен нулю, это указывает на то, что заметного члена второго порядка k_1 нет и вся реакция является катализируемой.

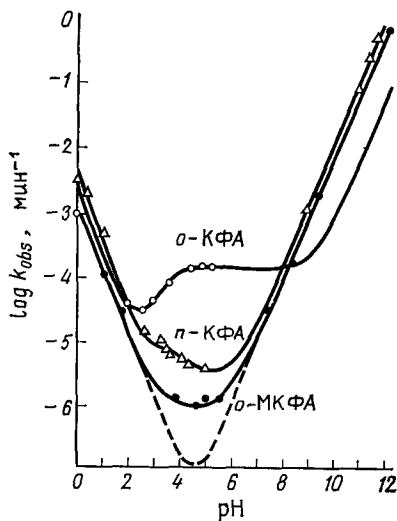
Если реакция содержит более одного члена третьего порядка, необходимо экстраполировать каждую кажущуюся константу скорости второго порядка к нулевой концентрации других реагентов, прежде чем выразить ее в виде зависимости от концентрации обсуждаемого реагента. Несмотря на то что эта операция трудоемка, она позволяет исследовать кинетику таких реакций, изучение которых другими методами трудно или даже невозможно. Простейший метод, если это возможно, заключается в проведении реакции при достаточно низкой концентрации других реагентов, так что для этих реагентов существенным являются лишь члены первого порядка. Аминоллиз фенилацетата катализируется ионом гидроксила так же, как и второй молекулой амина [уравнение (37), k_{OH^-}]. Поэтому наблюдаемую константу скорости можно разделить на константы, соответствующие вкладам щелочного

и аминного катализа k_{RNH_2} и k_{OH^-} при использовании данных, полученных в условиях, в которых наибольший вклад в наблюдаемую скорость связан с одним из этих членов, и введении соответствующих поправок на вклады других членов, как это показано на рис. 10 и 11 [12].

3. ВЛИЯНИЕ pH И ИОНИЗАЦИЯ РЕАГЕНТОВ

Гидролиз эфиров протекает с участием процессов, катализируемых кислотой и ионом гидроксила, а также с участием независимой от pH реакции, как это представлено уравнением (38). Для каждого данного эфира некоторые

из этих членов могут не вносить существенного вклада в скорость гидролиза. В качестве примера на рис. 12 приведена зависимость от pH скорости гидролиза метил-*о*-карбоксифенилацетата (I) с образованием фенольной группы (нижняя кривая) [13]

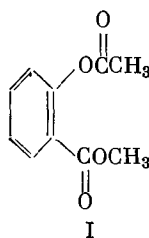


Р и с. 12. Логарифмическая зависимость от значения pH констант скоростей гидролиза аспирин (*о*-КФА), *п*-карбоксифенилацетата (*п*-КФА) и метил-*о*-карбоксифенилацетата (*о*-МКФА).

— — — — — скорость гидролиза *о*-МКФА в случае, если бы протекал только кислотный и основной катализ гидролиза в отсутствие независимой от pH реакции с водой [13].

пии в промежуточной области значений pH. Увеличение наблюдаемой скорости выше этой линии соответствует независимой от pH реакции с водой. Парциальные кинетические константы вычисляют из зависимости k_{obs} от концентрации ионов водорода и гидроксила. (Если гидролиз катализируется буфером, необходимо определить константы скорости при разных концентрациях буфера и каждом значении pH и экстраполировать их к нулевой концентрации буфера.) Наклоны зависимостей k_{obs} от концентрации ионов водорода или гидроксила дают константы скорости второго порядка для гидролиза, катализируемого кислотой или основанием; пересечение их с осью ординат дает константу скорости псевдопервого порядка не зависящей от pH «водной» реакции.

Как правило, практически невозможно определить порядок реакции относительно молекул растворителя с использованием обычных кинетических методов, поскольку невозможно варьировать концентрацию растворителя без изменения его природы. Если принять, что «водный» гидролиз представляет собой реакцию молекулы сложного эфира с молекулой воды, экспериментальную константу псевдопервого порядка можно перевести в константу



При низких и при высоких значениях pH константа скорости увеличивается в этих логарифмических координатах с тангенсом угла наклона 1,0, что соответствует кислотно и основно катализируемому гидролизу, которые описываются реакциями первого порядка относительно ионов водорода и гидроксила [k_{H^+} и k_{OH^-} , уравнение (38)]

$$\frac{v}{[\text{эфир}]} = k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-]. \quad (38)$$

Пунктирная линия соответствует сумме кислотно и основно катализируемой реакции. Увеличение наблюдаемой скорости выше этой линии соответствует независимой от pH реакции с водой. Парциальные кинетические константы вычисляют из зависимости k_{obs} от концентрации ионов водорода и гидроксила. (Если гидролиз катализируется буфером, необходимо определить константы скорости при разных концентрациях буфера и каждом значении pH и экстраполировать их к нулевой концентрации буфера.) Наклоны зависимостей k_{obs} от концентрации ионов водорода или гидроксила дают константы скорости второго порядка для гидролиза, катализируемого кислотой или основанием; пересечение их с осью ординат дает константу скорости псевдопервого порядка не зависящей от pH «водной» реакции.

Как правило, практически невозможно определить порядок реакции относительно молекул растворителя с использованием обычных кинетических методов, поскольку невозможно варьировать концентрацию растворителя без изменения его природы. Если принять, что «водный» гидролиз представляет собой реакцию молекулы сложного эфира с молекулой воды, экспериментальную константу псевдопервого порядка можно перевести в константу

второго порядка, разделив ее на концентрацию воды, равную 55,5 М. Если при данном значении рН существенный вклад в наблюдаемую скорость реакции связан как с кислотным, так и щелочным катализом, то, прежде чем откладывать наблюдаемую скорость от концентрации кислоты, необходимо серией последовательных приближений исправить каждую константу скорости на величину, соответствующую основному катализу и наоборот. Обычно это сделать нетрудно, однако наиболее точные значения констант скоростей можно получить при высоких концентрациях кислоты или основания в условиях, когда можно практически пренебречь другими реакциями.

Кинетические результаты обычно выражают в терминах *концентрации* реагентов. Это не представляет трудностей, если кислотно или основно катализируемые реакции изучают в присутствии известных концентраций добавленной кислоты или иона гидроксидов. Однако измерения скорости с применением для определения концентрации кислоты или основания значений рН приводят к константам скорости для кислотно или основно катализируемых реакций, основанным на *активностях*, а не на концентрациях реагентов. Это связано с тем, что рН является мерой активности ионов водорода, а K_w — константа ионизации воды, постоянная при данной ионной силе только для активностей [уравнение (39)]:

$$K_w = a_{H^+} \cdot a_{OH^-} = 10^{-14} \text{ при } 25^\circ \text{C.} \quad (39)$$

Если необходимо вычислить величину a_{OH^-} из измеренных рН и K_w , нужно использовать величины рН и K_w , полученные при той же температуре, что и проведенные кинетические измерения. Константы скорости, основанные на активности, могут быть пересчитаны в константы скорости, основанные на концентрациях, путем умножения на соответствующие коэффициенты активности. Коэффициенты активности, необходимые для этой цели, легче всего найти путем измерения рН растворов, содержащих известную концентрацию ионов водорода или гидроксидов в присутствии соли, используемой для создания ионной силы в реакционной смеси.

Полное уравнение скорости для реакции, содержащей способные к ионизации реагирующие вещества, должно включать скорости реакции для каждой ионной формы реагента. Желательно уже на ранних стадиях анализа кинетических результатов пересчитывать наблюдаемые константы скорости в константы скорости, отнесенные к ионным формам каждого реагента. (Вследствие кинетической двусмысленности уравнений скорости, как правило, невозможно при помощи обычных кинетических методов решить, действительно ли данная ионная форма является частицей, принимающей участие в реакции. Следует, однако, описывать скорость реакции, основываясь на той или иной ионной форме реагента; если в дальнейшем возникает необходимость, это выражение можно преобразовать в кинетически эквивалентные формы.) Для того чтобы получить константу скорости, отнесенную к данной ионной форме реагента, необходимо наблюдаемую константу скорости поделить на долю реагента в данной ионной форме. Эта доля может быть получена из уравнения Хендерсона — Хассельбалха, в котором α представляет собой

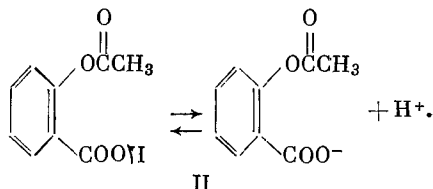
$$pH = pK'_a + \log \frac{[\text{основание}]}{[\text{кислота}]} = pK'_a + \log \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (40)$$

долю реагента в основной форме. Чувствительность кажущихся констант ионизации к изменениям ионной силы, температуры и других условий проведения реакции делает необходимым определение рН, а также pK'_a в точных экспериментальных условиях каждого кинетического измерения. Довольно часто использование значений α , вычисленных из величин pK'_a и измеренных в других экспериментальных условиях, приводит к неправильным константам скорости и даже к ложным дополнительным членам в уравнении скорости. По этой причине важно указывать значения pK'_a , использованные для вычис-

ления α . Для реагента, который присутствует в большом избытке, например буфера, много проще и точнее определять значение α из стехиометрического состава буфера, добавленного к реакционной смеси, что позволяет избежать ошибок в измерениях pH и pK'_a .*

Если при делении наблюдаемых констант скоростей на α (или $1-\alpha$), для каждого реагента не получается постоянного значения, что указывает либо на наличие дополнительного члена, содержащего концентрацию ионов водорода или гидроксидов в уравнении скорости, либо на то, что обе ионные формы субстрата реагируют с заметными скоростями и в уравнение скорости должны быть включены члены для обеих реакций. Наиболее прямой путь для вычисления этих членов заключается в построении зависимости наблюдаемой константы скорости от α . Пересечение этой прямой с осью ординат дает константу скорости реакции с кислой формой реагирующего вещества, пересечение с ординатой при $\alpha = 1,0$ дает константу скорости для основной формы. Если в исследуемом диапазоне pH более чем одно реагирующее соединение претерпевает ионизацию, то, прежде чем откладывать k_{obs} от α для одного реагента, эту величину надо разделить на α для другого реагента (или, если реагирующее вещество присутствует в большом избытке, на концентрацию данной ионной формы).

На рис. 12 показана зависимость от pH скорости гидролиза аспирина *o*-КФА(II)



Характерной особенностью этой кривой является существование быстрого, независимого от pH гидролиза в диапазоне pH 5—8 [14]. Константу скорости можно получить с использованием любой точки на этом плато без поправок на кислотно или основно катализируемые реакции. Константа скорости для независимого от pH гидролиза кислотной, незаряженной формы аспирина слишком мала, чтобы вносить существенный вклад в наблюдаемые скорости при любом pH, и может быть найдена из зависимости наблюдаемых констант скоростей, исправленных на скорость кислотно катализируемого гидролиза, от α . Гидролиз *n*-карбоксифенилацетата (*n*-КФА) не обнаруживает быстрой реакции моноаниона, характерной для *орто*-производного аспирина (рис. 12). Поэтому, чтобы найти константы скорости для независимого от pH гидролиза кислотной и анионной формы реагента, наблюдаемые константы скорости следует исправить как на кислотно, так и на основно катализируемый гидролиз и затем отложить в зависимости от α . Кривые на рис. 12 вычислены на основании констант скорости, полученных таким образом в соответствии с общим уравнением скорости (41), в котором k_a и k_b — константы скорости для некатализируемого гидролиза кислотной и основной формы реагента.

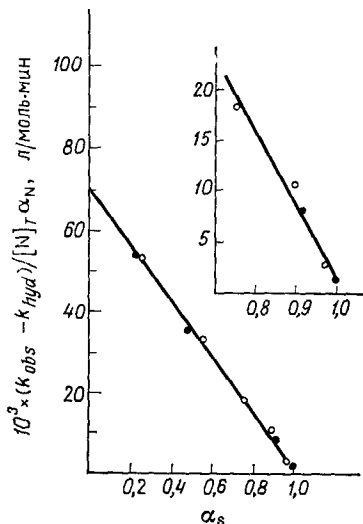
$$\text{скорость} = k_{H^+} [SH] a_{H^+} + k_a [SH] + k_b [S^-] + k_{OH^-} [S^-] a_{OH^-}, \quad (41)$$

* Этот метод будет приводить к ошибкам при высоких и низких значениях pH, при которых заметная доля кислотного или основного компонента добавленного буфера должна отдать или присоединить протон для достижения конечного значения pH раствора. Так, чтобы достигнуть pH 2,0, необходимо добавить 0,01 M ионов водорода, что вызовет существенное уменьшение концентрации кислотного компонента и соответствующее увеличение концентрации основного компонента в наполовину нейтрализованном 0,05 M буфере с pK 2,0. Чтобы внести поправку на эту диссоциацию необходимо: 1) измерить pH раствора; 2) вычислить концентрацию ионов водорода из pH и коэффициентов активности ионов водорода в условиях эксперимента и 3) вычесть эту величину из кислотного и прибавить ее к основному компоненту буфера.

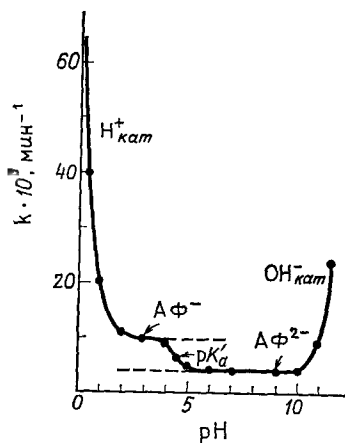
Константы скорости реакций кислотной и анионной формы аспирина с семикарбазидом, который претерпевает протонизацию с образованием неактивного катиона в той же области рН, в которой аспирин претерпевает диссоциацию на анион, можно вычислить, как показано на рис. 13, в соответствии с уравнением скорости

$$v = k_a [o\text{-КФА}^0] + k_b [o\text{-КФА}^-] + k_3 [o\text{-КФА}^0] [\text{RNH}_2] + k_4 [o\text{-КФА}^-] [\text{RNH}_2]. \quad (42)$$

Наблюдаемые константы скорости после поправок на гидролиз делят на концентрацию свободного семикарбазида и затем откладывают как функцию



Р и с. 13. Зависимость кажущихся констант скоростей реакции семикарбазида с аспирином от доли аспирина в анионной форме α_s . $[N]_T$ и α_N относятся к общей концентрации семикарбазида и доли семикарбазида как свободного основания соответственно [13].



Р и с. 14. Зависимость гидролиза ацетилфосфата от значения рН при 39°C. Реакция включает кислотный и основной катализ гидролиза и независимый от рН гидролиз моноаниона и дианиона. Значение pK'_a для диссоциации моноаниона на дианион и протон равно рН средней точки между скоростями гидролиза отдельных форм [15, 16].

от доли аспирина в виде аниона при каждом значении рН. Тот факт, что ордината пересечения k_3 много больше, чем ордината пересечения k_4 при $\alpha = 1,0$, отражает большую чувствительность к атаке семикарбазидом аспирина в виде нейтральной молекулы по сравнению с аспирином-анионом.

В некоторых случаях можно сделать обратную процедуру и из зависимости скорости от рН определить константы ионизации реагента. Это особенно удобно, если соединение настолько нестабильно, что его рК нельзя определить обычными методами. Для этого не требуется дополнительных условий, за исключением того, что в исследуемой области рН не должно происходить изменения скорость определяющей стадии реакции. Для реакции, в которой точно известны константы скорости при значениях рН выше и ниже рК и нет влияния дополнительных кинетических членов, значение рК реагента можно просто найти из зависимости k_{obs} от рН по положению средней точки для ΔK — разности констант скорости реакции двух форм. Для гидролиза моно- и дианиона ацетилфосфата это представлено на рис. 14 [15, 16].

Существует несколько более точных методов для определения величин рК из кинетических данных. Так, если константы скорости k_a и k_b для реакции кислотной и основной формы реагента точно известны из непосредственного измерения или при введении поправок в k_{obs} на вклад k_{H^+} или k_{OH^-} ,

значение pK можно получить из зависимости $\log [(k_{\text{obs}} - k_a)/(k_b - k_{\text{obs}})]$ или $\log [(k_a - k_{\text{obs}})/(k_{\text{obs}} - k_b)]$ от pH . Значение pK равно значению pH , при котором эта величина равна нулю. Подобная зависимость является выражением уравнения Хендерсона — Хассельбалха, модифицированным для того, чтобы описать зависимость k_{obs} от k_a , k_b и pH в соответствии с уравнением

$$k_{\text{obs}} = k_b \alpha + k_a (1 - \alpha). \quad (43)$$

Кривизна в верхнем или нижнем участке этой зависимости означает, что величина k_a или k_b определена неверно. Наклон этой прямой в случае, если в реакцию включается только одна ионогенная группа, должен быть равен 1,0.

В случае если активной является лишь одна форма реагирующей частицы и невозможно найти точное значение константы скорости, проводят эксперимент в области pH , в которой реагирующее вещество полностью превращено в активную форму, а значения pK и предельной константы скорости можно получить, используя методы экстраполяции. Из них наиболее удовлетворительный метод, если реагирующей является основная форма субстрата, заключается в построении зависимости k_{obs} от $k_{\text{obs}} a_{H^+}$ [уравнение (44)]:

$$k_{\text{obs}} = k_b - \frac{k_{\text{obs}} a_{H^+}}{K_a}. \quad (44)$$

Значения k_b и константы ионизации получают из пересечения с осью ординат и углового коэффициента этой прямой. В случае если активной частицей является кислотная форма этого вещества, строят зависимость k_{obs} от k_{obs}/a_{H^+} , где ордината пересечения есть k_a , тангенс угла наклона этой прямой равен $-K_a$ [уравнение (45)]. Эти уравнения получены из

$$k_{\text{obs}} = k_a - \frac{k_{\text{obs}} K_a}{a_{H^+}} \quad (45)$$

уравнения константы ионизации в предположении, что k_{obs} пропорциональна концентрации субстрата в активной форме [17]. Альтернативный метод заключается в построении зависимости $1/k_{\text{obs}}$ от $1/a_{H^+}$, если активной частицей является кислотная форма, или от a_{H^+} , если реагирует основная форма. Ордината пересечения есть обратная величина k_a (или k_b), абсцисса пересечения дает отрицательную величину $1/K_a$ (или K_a). Зависимости в обратных координатах, так же как и координаты Лайнуивера — Берка в ферментативной кинетике, следует использовать с осторожностью, так как они имеют тот недостаток, что точки вблизи k_a (или k_b) группируются около оси ординат, в то время как более медленные константы скорости имеют большой разброс. Если реакционноспособными являются обе формы реагента, можно использовать любой из описанных выше методов, однако из k_{obs} необходимо вычесть константу скорости для более медленно реагирующей частицы. В этом случае ордината пересечения даст $k_b - k_a$ или $k_a - k_b$ вместо k_a или k_b . Эти экстраполяционные методы также могут быть полезны и при определении величин pK обычными, некинетическими методами.

В случае если увеличение скорости реакции нельзя объяснить ионизацией одного из реагирующих веществ, влияние концентрации ионов водорода или гидроксидов на скорость реакции необходимо интерпретировать так же, как и для других реагентов, т. е. считать, что увеличение скорости реакции описывается дополнительным членом в уравнении скорости, содержащим концентрацию ионов водорода или гидроксидов. Уменьшение скорости реакции, которое не может быть объяснено ионизацией реагентов, означает, что происходит изменение скорости определяющей стадии реакции, как это описано для некоторых реакций в гл. 10.

4. СОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ И ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Для предотвращения изменения реакционной среды в серии экспериментов, желательно проводить реакции при постоянной ионной силе и постоянном составе растворителя. Прежде чем начинать большую серию измерений, необходимо выбрать стандартные экспериментальные условия. В случае использования высоких концентраций реагирующего вещества или буфера само вещество может изменить природу растворителя, причем часто бывает трудно сделать правильные поправки. Различные теоретические уравнения, описывающие влияние солей или растворителей на скорости реакций, практически имеют так много исключений, что являются почти бесполезными для введения поправок в наблюдаемые скорости реакций в отсутствие непосредственных экспериментальных данных, демонстрирующих их справедливость для исследуемой реакции. Поэтому желательно, если это возможно, сделать непосредственную экспериментальную оценку влияния изменений в условиях реакции. Приведение к постоянной ионной силе можно осуществить в соответствии с простым уравнением Дебая — Хюккеля, однако даже в умеренно концентрированных растворах специфическое влияние ионов и растворителя на коэффициенты активности реагентов и переходного состояния (гл. 7 и 8) становится много большим, чем эффект Дебая — Хюккеля, и может приводить к существенному изменению кинетического поведения. Так, общесловной и общекислотный катализ аминолиза фенилацетата алкиламинами трудно обнаружить, если ионная сила создается хлоридом калия, который в противоположность хлориду тетраметиламмония обнаруживает специфический ускоряющий эффект [12, 18]. Влияние других изменений в природе растворителя, вызванных реагентами или буферными соединениями, можно оценить при исследовании влияния соответствующих модельных соединений. Например, диоксан можно использовать в качестве модели для оценки влияния углеводород-эфирного кольца морфолина. Тот факт, что такие модельные соединения означают, что необходимо внимательно относиться к небольшим изменениям в константах скорости (связанным, например, с малыми каталитическими членами), проявляющимся при высоких концентрациях реагентов, особенно если известно, что реакция чувствительна к влиянию солей и растворителя. Большую чувствительность некоторых реакций незаряженных молекул к влиянию растворителей можно проиллюстрировать 50%-ным уменьшением скорости гидролиза ангидрида ацетилсалициловой кислоты в присутствии 10% диоксана [19].

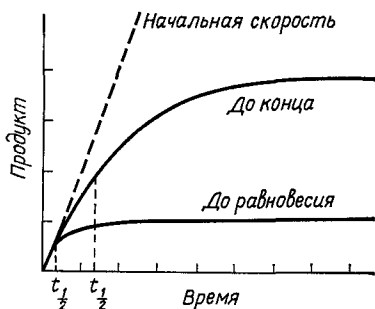
5. ОБРАТИМЫЕ РЕАКЦИИ

Кинетическое уравнение для реакции, которая протекает до состояния равновесия, усложняется, если процесс включает реакцию более чем первого порядка в любом направлении. Кинетическое описание существенно упрощается в случаях, если можно: 1) довести реакцию до конца, используя вторую реакцию, которая сдвигает равновесие (это может быть, например, протонирование, гидролиз или отделение продукта); 2) измерить начальные скорости процесса в условиях, в которых обратная реакция не существенна; 3) исследовать реакцию в условиях, в которых реакция имеет (псевдо)первый порядок в каждом направлении.

Может показаться удивительным, что наблюдаемая константа скорости обратимой реакции первого порядка *больше*, чем константа скорости первого порядка для реакции в прямом или обратном направлении; фактически она равна сумме этих двух констант [уравнение (46)]:

$$k_{\text{obs}} = k_f + k_r. \quad (46)$$

Причины этого явления становятся понятными, если сравнить протекание реакции (рис. 15) в условиях, когда она доводится до конца отделением продукта (верхняя кривая) и когда она протекает до равновесия (нижняя кривая). Верхняя кривая дает время полупревращения и константу скорости для прямой реакции без влияния обратной реакции. Нижняя кривая имеет ту же самую начальную скорость образования продукта, которая падает по мере накопления продукта, и существенной становится обратная реакция. Сле-



Р и с. 15. Протекание во времени обратимой реакции первого порядка, идущей до конца (верхняя кривая) и протекающей до равновесия (нижняя кривая).

в каждом направлении легко можно определить из наблюдаемой константы скорости и константы равновесия [уравнения (46) и (48)]

$$K_{\text{app}} = \frac{k_f}{k_r} \quad (48)$$

Часто можно измерить константу равновесия для реакции вида (49), в которой непоглощающий компонент В присутствует в большом избытке, при сравнении изменений в поглощении, наблюдаемых для реакции, протекающей до равновесия, с



$$K = \frac{[C]}{[A][B]} = \frac{\Delta A_{\text{eq}}}{\Delta A_{\text{max}} - \Delta A_{\text{eq}}} \frac{1}{[B]} = K_{\text{app}} \frac{1}{[B]}. \quad (50)$$

изменениями, которые наблюдаются, если реакция протекает практически до конца при много более высокой концентрации В [уравнение (50)], что не требует знания концентрации или коэффициента экстинкции продукта. В уравнении (50) ΔA_{eq} и ΔA_{max} соответствуют поглощению продукта при равновесии и поглощению продукта в реакции, доведенной до конца большой концентрацией В. Если необходимо, значения ΔA_{max} и K_{app} можно получить из зависимости $1/\Delta A$ от $1/[B]$ по ординате и абсциссе пересечения зависимости с осями или из соответствующих графических элементов зависимости ΔA от $\Delta A/[B]$. Эти зависимости аналогичны применяемым для определения кислотных констант диссоциации (ч. 3). Если величины k_f , k_r и K_{app} определены для реакции (псевдо)первого порядка при разных концентрациях реагента, присутствующего в большом избытке, можно получить константу скорости второго порядка для прямой реакции уравнения (49), основываясь на соотношении $k_f = k_1[B]$. Альтернативно константы можно получить графически из зависимости k_{obs} от $[B]$; ордината пересечения дает k_r , абсцисса пересечения даст $-1/K$ [20].

довательно, для реакции, протекающей до равновесия, как предельное значение, так и время полупревращения будут меньше (наблюдаемая константа скорости будет больше) по сравнению с реакцией, протекающей до конца. Этот случай представляет собой один из нескольких примеров, в которых необходимо делать строгое различие между абсолютной скоростью (в моль/л·мин) и константой скорости реакции.

Кинетическая кривая обратимой реакции первого порядка описывается уравнением

$$\ln \left(\frac{A_0 - [A]_{\text{eq}}}{[A] - [A]_{\text{eq}}} \right) = (k_f + k_r) t = k_{\text{obs}} t. \quad (47)$$

Если для данных экспериментальных условий кажущаяся константа равновесия K_{app} известна, то константы скорости реакции

6. ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН ПРИ РАВНОВЕСИИ

Часто оказывается полезным измерять скорость реакции в условиях, в которых не происходит изменения концентрации реагентов, путем измерения времени, необходимого для того, чтобы небольшое количество изотопно меченного исходного вещества дало меченый продукт. Изменения в количестве метки в исходном соединении или продукте реакции всегда подчиняются кинетике первого порядка независимо от порядка протекающей реакции [21]. Однако искомой величиной является не скорость обмена изотопов, а абсолютная скорость превращения как меченых, так и немеченых молекул реагента с образованием продукта реакции. Эту скорость можно определить при измерении начальных скоростей включения изотопа или при умножении константы скорости первого порядка включения изотопа, полученной обычным путем, на множитель $ab/(a+b)$ в соответствии с уравнением

$$-\ln \left(\frac{x_{\infty} - x}{x_{\infty}} \right) = R \frac{(a+b)}{ab} t = kt, \quad (51)$$

которое описывает обмен первого порядка меченых молекул BX^* с образованием меченого AX^* , протекающий по уравнению (52). Величины x , a и b определяют из уравнений (53) — (55). Кинетику реакции обычно исследуют, изучая зависимость R от концентрации реагентов. Существование заметного



$$[AX^*] = x, \quad (53)$$

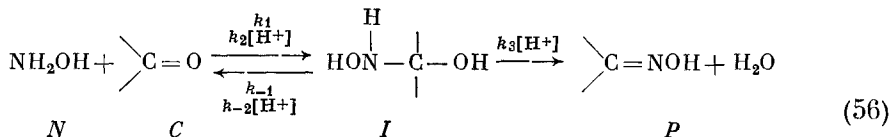
$$[AX] + [AX^*] = a, \quad (54)$$

$$[BX] + [BX^*] = b. \quad (55)$$

изотопного эффекта приводит к тому, что скорость изотопного обмена не является точной мерой скорости реакции немеченых молекул.

В. УРАВНЕНИЯ СТАЦИОНАРНОЙ СКОРОСТИ

Уравнение скорости для реакции, которая протекает в несколько стадий, обычно получают, предполагая стационарность промежуточных соединений в данном механизме реакции. Лучше всего это объяснить на примере, в качестве которого рассмотрим реакцию альдегида с гидроксиламином, ведущую к образованию оксима и протекающую, как описано в гл. 10, через образование промежуточного продукта присоединения. При нейтральных значениях pH присоединение гидроксиламина к альдегиду идет быстро и обратимо, за чем следует медленный катализируемый кислотой процесс дегидратации продукта присоединения [схема (56)]. При низких значениях pH, когда уменьшается концентрация свободного амина, а скорость катализируемой кислотой



дегидратации становится очень большой, лимитирующей становится атака альдегида амином; скорость реакции меньше, чем величина, предсказываемая уравнением скорости при высоких значениях pH, т. е. в данном случае наблюдается изменение скорости определяющей стадии. При очень низких pH скорость опять выравнивается и не зависит от pH, поскольку заметной становится катализируемая кислотой атака альдегида свободным амином; с увеличением кислотности уменьшение концентрации свободного амина точно уравновешивается увеличением скорости катализируемой кислотой атаки

амина. Эти стадии механизма реакции на схеме (56) охарактеризованы соответствующими константами скорости; там же обозначены концентрации амина, карбонильного соединения и продукта реакции символами N , C и P соответственно.

Методы стационарной кинетики основаны на предположении, что скорость изменения концентрации промежуточного соединения равна нулю или не существенна по сравнению с изменением других реагентов или продуктов [уравнение (57)]:

$$\frac{dI}{dt} \cong 0. \quad (57)$$

Это предположение может вызвать некоторое недоумение, поскольку *каждый распад* промежуточного соединения приводит к образованию продукта и константа скорости первого порядка для распада промежуточного продукта в реакции, которая подчиняется общему первому порядку, должна быть равна константе скорости всей реакции. Однако существенным является то, что *абсолютная* скорость изменения концентрации промежуточного соединения, накапливающегося в заметной степени, выраженная в моль/л·мин, является очень небольшой по сравнению со скоростью изменения концентраций реагентов и продуктов. Для реакции гидроксиламина стационарное рассмотрение кинетики реакции можно применить при исследовании реакции в условиях низких значений рН, в которых большая часть гидроксиламина протонируется и не происходит заметного накопления промежуточного продукта; стационарную кинетику, однако, нельзя использовать для анализа экспериментальных данных при высоких значениях рН, когда концентрация свободного гидроксиламина достаточно высока и способна превратить существенную долю карбонильного соединения в промежуточный продукт присоединения.

Изменение концентрации промежуточного соединения определяется скоростью образования минус скорость исчезновения вещества, так что уравнение (57) можно записать в соответствии со схемой (56) в виде (58). Это уравнение, решенное относительно неизвестной концентрации промежуточного соединения I , дает уравнение (59)

$$\frac{dI}{dt} = 0 = (k_1 + k_2 a_{H^+}) NC - (k_{-1} + k_{-2} a_{H^+} + k_3 a_{H^+}) I. \quad (58)$$

$$I = \frac{(k_1 + k_2 a_{H^+}) NC}{k_{-1} + k_{-2} a_{H^+} + k_3 a_{H^+}}. \quad (59)$$

Для реакции, в которой образование продукта в условиях измерения является необратимым процессом, скорость образования продукта определяется концентрацией промежуточного соединения I (60). Величина I , выраженная через константы скорости образования и исчезновения промежуточного продукта, дается уравнением (59); подстановка дает полное уравнение стационарной скорости

$$v = \frac{dP}{dt} = k_3 a_{H^+} I = \frac{k_3 a_{H^+} (k_1 + k_2 a_{H^+}) NC}{k_{-1} + k_{-2} a_{H^+} + k_3 a_{H^+}}. \quad (60)$$

Это уравнение можно сопоставить с экспериментальными данными. Обычно удобно перенести одну или обе переменные N и C в левую часть уравнения и описывать экспериментальные результаты в терминах кажущихся констант первого или второго порядка. Если реакцию проводят в присутствии большого избытка N , константу скорости псевдопервого порядка получают делением обеих частей уравнения на C ; кажущуюся константу скорости второго порядка k' получаем при делении обеих частей уравнения на N и C [уравнение (61)]. В уравнение скорости можно включить члены, являющиеся поправ-

$$\frac{v}{NC} = k' = \frac{k_{obs}}{N} = \frac{k_3 a_{H^+} (k_1 + k_2 a_{H^+})}{k_{-1} + k_{-2} a_{H^+} + k_3 a_{H^+}} \quad (61)$$

ками на ионизацию каждого реагента, однако это ведет к усложнению уравнения, и лучше приводить наблюдаемые константы скорости к константам скорости той или иной формы каждого реагента делением на долю реагента данной ионной формы при каждом значении рН.

Следующей стадией является исследование уравнения (61) в предельных условиях, с тем чтобы быть уверенным, что оно верно описывает характер механизма реакции [схема (56)]; кроме того, это необходимо и для того, чтобы обнаружить возможные ошибки при его выводе. Перечисленные ниже предельные области значений рН существенны для реакции образования оксима.

а) *Низкие a_{H^+} (высокие значения рН).* Члены в круглых скобках и в знаменателе уравнения (61), которые содержат величины a_{H^+} , становятся малыми по сравнению с другими членами, и ими практически можно пренебречь. Таким образом, уравнение (61) приводится к простой форме уравнения (62), в котором K_1 является константой равновесия первой стадии реакции. Следовательно, это уравнение описывает реакцию при высоких значениях рН, при которых на быстрой равновесной стадии происходит присоединение гидроксилamina и наблюдаемая скорость реакции зависит от равновесной концентрации продукта присоединения и скорости его разложения, катализируемого кислотой. Из наблюдаемой скорости реакции в этой области рН можно получить числовое значение $k_1 k_3 / k_{-1}$ (при условии, что предпо-

$$\frac{k_{\text{obs}}}{N} = \frac{k_1}{k_{-1}} k_3 a_{H^+} = K_1 k_3 a_{H^+} \quad (62)$$

ложение о стационарном протекании реакции верно, т. е. экспериментальные данные получены при достаточно низкой концентрации гидроксилamina, так что не происходит заметного накапливания промежуточного соединения).

б) *Промежуточные значения a_{H^+} и рН.* В этой области значений рН происходит изменение скорость определяющей стадии и начинает лимитировать атака карбонильного соединения амином, что эквивалентно утверждениям $k_3 a_{H^+} \gg k_{-1}$ и $k_3 a_{H^+} \gg k_{-2} a_{H^+}$. Если промежуточное соединение возвращается в исходные вещества много быстрее, чем оно переходит в продукты, устанавливается равновесие с исходными соединениями, и скорость определяющей является последующая стадия. Если переход к продуктам происходит много быстрее, чем возвращение к исходным соединениям, каждая молекула образовавшегося промежуточного соединения превращается в продукт, и образование промежуточного продукта лимитирует всю реакцию. Важно понять это положение и помнить, что для реакции типа (56) (т. е. с предшествующей равновесной стадией) в стационарном состоянии скорость определяющую стадию определяют не абсолютные значения констант скоростей двух последовательных стадий (например, k_1 и $k_3 a_{H^+}$). Возможны случаи (и это не является необычным), в которых константа скорости второй стадии много больше, чем первой, однако вторая стадия является скоростью определяющей. Единственным критерием того, какая стадия определяет скорость, является относительная величина скоростей разложения промежуточного соединения на исходные соединения и продукты реакции в данных экспериментальных условиях (рис. 4, гл. 10). При использовании указанных выше неравенств и в предположении, что $k_1 \gg k_2 a_{H^+}$, уравнение скорости для реакции гидроксилamina приводится к виду

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_3 a_{H^+} k_1 N}{k_3 a_{H^+}} = k_1 N. \quad (63)$$

Это уравнение описывает атаку свободного амина, и величину k_1 можно определить из наблюдаемой скорости реакции в условиях, в которых эта стадия является скоростью определяющей.

в) *Высокие a_{H^+} (низкие рН).* При высокой кислотности скорость определяющей становится катализируемая кислотой атака свободного амина,

поскольку $k_2 a_{H^+}$ становится больше, чем k_1 . Как и в предыдущем случае, справедливы те же неравенства относительно k_3 , и уравнение скорости приводится к виду

$$k_{\text{obs}} = (k_1 + k_2 a_{H^+}) N. \quad (64)$$

Так как оба члена k_1 и $k_2 a_{H^+}$, по-видимому, дают заметный вклад в наблюдаемую скорость атаки в условиях эксперимента, их величины лучше всего найти, откладывая k_{obs}/N от a_{H^+} и получая k_2 и k_1 из наклона и отрезка, отсекаемого на оси ординат.

Эти предельные случаи дают числовые значения k_1 , k_2 и поскольку k_1 известна, то и k_3/k_{-1} . Константа равновесия для первой стадии реакции та же независимо от того, какой путь используется для достижения равновесия, т. е. $k_1/k_{-1} = k_2/k_{-2}$. Поэтому величину k_3/k_{-2} можно определить из уравнения (65) и известного значения k_2 :

$$K_1 k_3 = \frac{k_1}{k_{-1}} k_3 = \frac{k_2}{k_{-2}} k_3. \quad (65)$$

Эти константы скорости — константы первой стадии процесса и отношения констант скоростей для разложения промежуточного соединения на исходные материалы и продукты — представляют собой все константы скорости, которые можно получить из стационарного рассмотрения реакции. Стационарные эксперименты не дают информации, которую можно было бы использовать для получения константы равновесия образования промежуточного соединения K_1 или абсолютного значения константы скорости разложения комплекса k_3 .

Используя известные значения констант, можно вычислить величину k_{obs} при любом значении pH, и это необходимо сделать, чтобы убедиться, действительно ли уравнение стационарной скорости точно описывает экспериментальные результаты при промежуточных значениях pH, при которых скорость определяющей является более чем одна стадия. Для этой цели полезно преобразовать уравнение (64) в форму (66), для которой все величины в правой части известны:

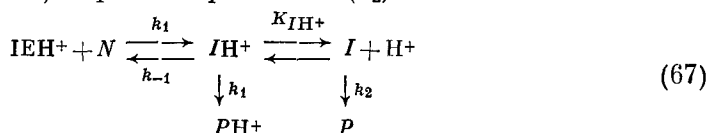
$$k_{\text{obs}} = \frac{(k_1 + k_2 a_{H^+}) a_{H^+} N}{k_{-1}/k_3 + k_{-2} a_{H^+}/k_3 + a_{H^+}}. \quad (66)$$

Непрерывная линия на рис. 4 гл. 10 вычислена на основании уравнения стационарной скорости (66). Скорости катализируемой кислотой дегидратации промежуточного соединения в равновесной концентрации и атака гидроксил-амином по не катализируемой кислотой реакции представлены на этом рисунке пунктирной и точечной линиями соответственно [22].

Изложенное выше описание было основано на предположении, что различия в константах скоростей достаточно велики, так что та или иная стадия реакции при данных условиях эксперимента становится почти полностью скоростью определяющей, и константы скорости для этой стадии можно вычислить непосредственно из экспериментальных констант скоростей. На практике, однако, этого часто не происходит, и обе стадии реакции дают заметный вклад в наблюдаемую скорость реакции при всех экспериментально достижимых условиях. Особенно часто это бывает в том случае, если два кинетических члена имеют одинаковую зависимость от кислотности, как, например, члены, содержащие k_2 и k_3 в уравнениях (56) и (60); если k_2 немного больше, чем k_3 , стадия дегидратации будет частично скоростью определяющей даже в сильно кислых растворах. Если предварительные расчеты показывают, что это имеет место, правильные значения констант можно получить последовательным приближением. Подстановка предварительных значений констант скоростей в уравнение стационарной скорости обычно дает указание на то, какие изменения необходимо сделать, чтобы учесть тот факт, что другие ста-

дии частично являются скоростью определяющими, так что числовые значения можно подбирать до тех пор, пока не будет получено удовлетворительного соответствия экспериментальным данным.

Часто можно преобразовать уравнение стационарной скорости и разделить переменные так, что значения констант скоростей можно получить из зависимостей, построенных в подходящих координатах. Например, реакция протонированных имидоэфиров (IEN^+) с аминами (N), приводящая к образованию амидинов (P) протекает в соответствии с механизмом (67), в котором при высоких значениях pH скоростью определяющей стадией является атака амином (k_1) и при низких — разложение промежуточного продукта присоединения (I и IH^+) через незаряженное (k_2)



и положительно заряженное (k_3) переходное состояние [23]. Уравнение стационарной скорости для этой системы [уравнение (68)], в котором f_{IEN^+} —

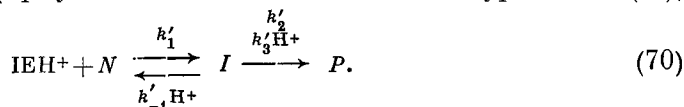
$$\frac{d(P + \text{PH}^+)}{dt} = \frac{k_{\text{obs}}}{Nf_{\text{IEN}^+}} = \frac{k_1(k_3 + k_2K_{\text{IH}^+}/a_{\text{H}^+})}{k_{-1} + k_3 + k_2K_{\text{IH}^+}/a_{\text{H}^+}}, \quad (68)$$

доля имидоэфира в протонированной форме, можно преобразовать в обратную форму [уравнение (69)], что позволяет найти некоторые кинетические параметры:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}/Nf_{\text{IEN}^+}} = \frac{k_{-1}a_{\text{H}^+}}{k_1k_3a_{\text{H}^+} + k_1k_2K_{\text{IH}^+}} + \frac{1}{k_1}. \quad (69)$$

Зависимость $k_{\text{obs}}/Nf_{\text{IEN}^+}$ от a_{H^+} дает вначале прямую линию с отрезком, отсекаемым на оси ординат, равным $1/k_1$, и наклоном, равным $k_{-1}/k_1k_2K_{\text{IH}^+}$. При более высокой кислотности член $k_1k_3a_{\text{H}^+}$ становится доминирующим и зависимость стремится к пределу, равному $k_{-1}/k_1k_3 + 1/k_1$.

Третья возможность определения констант скоростей заключается в использовании метода итераций или непосредственного вычисления при помощи электронной вычислительной машины, однако составление соответствующей программы часто занимает больше времени, чем использование более простых методов. Ранее уже отмечалось, что стационарная кинетика не в состоянии дать информацию, которая позволяла бы найти константу равновесия образования промежуточного соединения, присутствующего в стационарной концентрации, или абсолютную константу скорости его разложения. Также невозможно установить преимущественное ионное состояние или константу ионизации такого промежуточного соединения, если только оно не накапливается в заметных количествах. Фактически нет различия в уравнениях скорости, выведенных для катализируемой кислотой реакции нейтрального промежуточного соединения и для реакции сопряженной кислоты того же соединения; то же справедливо и для основного катализа. Так, механизм аминолита имидоэфира [схема (67)] может быть описан также механизмом (70), по которому нейтральное промежуточное соединение разлагается по не катализируемой и катализируемой кислотой реакции. Уравнение стационарной скорости для механизма (70) представлено уравнением (71). Оно имеет ту же форму и кинетически неотличимо от уравнения (68);



$$\frac{k_{\text{obs}}}{Nf_{\text{IEN}^+}} = \frac{k_1'(k_3' + k_2'/a_{\text{H}^+})}{k_{-1}' + k_3' + k_2'/a_{\text{H}^+}}. \quad (71)$$

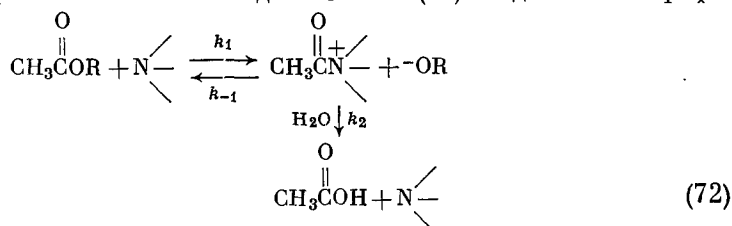
единственное различие заключается в том, что в уравнении (68) k'_2 заменено на $k_2K_{\text{H}^+}$. Можно представить себе еще один механизм реакции, который включает разложение протонированного промежуточного соединения по не катализируемому и катализируемому ионом гидроксила путям. Все эти механизмы совершенно эквивалентны и кинетически неразличимы, так что при использовании того или другого не следует делать заключений о детальном механизме реакции.

Важно помнить, что условия равновесия и принцип микроскопической обратимости должны быть приняты во внимание при использовании или упрощении уравнения стационарной скорости для обычных термических реакций. Например, в условиях, в которых $k_1 \gg k_2[\text{H}^+]$ [уравнения (56) и (61)], необходимо, чтобы и $k_1 \gg k_{-2}[\text{H}^+]$. Относительная возможность двух путей реакции для данного процесса должна быть одинаковой для реакции в обоих направлениях. Так, если можно показать, что какой-либо кинетический член не существен для реакции в одном направлении, также не существенным должен быть соответствующий член для реакции в обратном направлении.

Таким образом, стационарное кинетическое рассмотрение дает важное свидетельство в пользу двухстадийного механизма реакции и, следовательно, в пользу существования в реакции промежуточного соединения, однако кинетика не дает никакого указания, какая стадия является скоростью определяющей в данных условиях эксперимента, и почти всегда могут существовать эквивалентные механизмы, в которых скорость определяющие стадии обращены. Так, для реакции образования оксима можно написать кинетически эквивалентный механизм, по которому катализируемое кислотой образование промежуточного продукта присоединения является лимитирующим при высоких значениях pH, и разложение промежуточного соединения через нейтральное или катионное переходное состояние определяет скорость при низких значениях pH. Выбор между такими эквивалентными механизмами иногда можно сделать на основе некоторых химических предпосылок или аналогий с механизмами родственных реакций, однако обычно различить механизмы можно непосредственным доказательством того факта, что образование промежуточного соединения является быстрой стадией в данных условиях эксперимента. Это можно подтвердить (как и было сделано в реакции гидроксиламина при высоких pH [22]), показав, например, что промежуточное соединение накапливается или что существуют реакции обмена, которые протекают через образование промежуточного соединения, как в случае обмена аминов с имидоэфирами [23] или обмена меченого кислорода воды с тиоэфирами [24] при низких значениях pH. Некоторые примеры такого рода обсуждены в гл. 10.

1. ИНГИБИРОВАНИЕ ПЕРВЫМ ПРОДУКТОМ В ДВУХСТАДИЙНОЙ РЕАКЦИИ

Гидролиз *n*-нитрофенилацетата, катализируемый 4-метилпиридином, протекает через образование промежуточного иона ацетилпиридиния, который затем претерпевает гидролиз со скоростью, слишком большой, чтобы ее можно было измерить обычными методами [схема (72)]. Однако *n*-нитрофе-



нол, который выделяется на первой стадии реакции, может реагировать с промежуточным соединением, регенерируя исходное вещество, быстрее, чем реагирует вода с этим промежуточным соединением, давая продукты гидролиза [3]. Эта обратная реакция приводит к ингибированию наблюдаемой скорости гидролиза. Как показано на рис. 16, ингибирование становится заметным даже при малых концентрациях продукта вследствие высокой реакционной способности *n*-нитрофенолята по сравнению с водой. Ингибирование такой обратной реакцией вызывает отклонения от кинетики (псевдо)первого порядка, однако это отклонение трудно заметить.

Этот тип ингибирования может быть полезен по двум причинам. Во-первых, ингибирование продуктом показывает в случае, если существование промежуточного соединения нельзя показать непосредственно, что в реакции должно быть промежуточное соединение. Этот метод, например, дает возможность показать, что реакция протекает через нуклеофильный, а не общесосновной катализ. Во-вторых, это явление дает простой метод для определения относительных нуклеофильных реакционных способностей уходящей группы и растворителя по отношению к активному промежуточному соединению, что позволяет построить шкалу относительных реакционных способностей. Механизму (72) соответствует

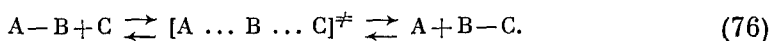
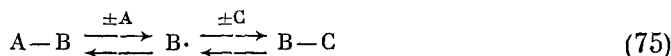
$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 k_2}{k_2 + k_{-1} [\text{RO}^-]} \quad (73)$$

Значение k_{-1}/k_2 для такого типа реакции можно получить из зависимости $1/k_{\text{obs}}$ от $[\text{RO}^-]$ {уравнение (74)}:

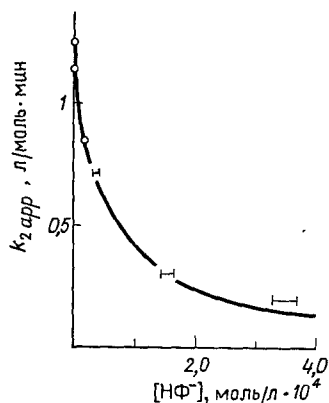
$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k_1} + \frac{k_{-1} [\text{RO}^-]}{k_1 k_2} \quad (74)$$

Г. ПРИЛОЖЕНИЯ ТЕОРИИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ

Перенос атома или группы В от А — В к С может происходить через полную диссоциацию связи А — В с образованием радикала, который присоединяется к С на второй стадии [схема (75)]; однако часто реакция может протекать по более или менее согласованному пути, по которому происходит некоторое образование связи между В и С прежде, чем связь А — В полностью разрушится [схема (76)]



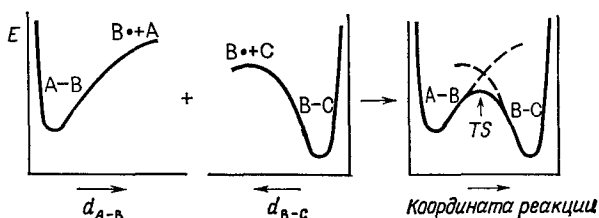
Двухстадийный механизм описывается энергетическими кривыми диссоциации А — В и В — С, в то время как согласованная реакция протекает по низкоэнергетическому пути, который можно рассматривать как комбинацию отдельных А — В и В — С энергетических кривых с использованием «координаты реакции». Координата реакции является функцией расстояний А — В и В — С (рис. 17). Наивысшая энергетическая точка между А — В и В — С на этой энергетической диаграмме есть переходное состояние. Смысл



Р и с. 16. Ингибирование добавленным ионом *n*-нитрофенола НФ- гидролиза *n*-нитрофенилацетата, катализируемого 4-метилпиридином, при ионной силе 1,0 моль/л и 25 °С.

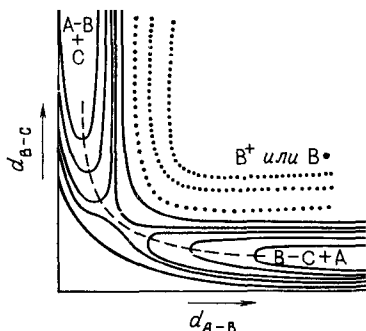
○ 50% свободного основания;
● 90% свободного основания
амина. Отрезки показывают пределы изменения концентрации *n*-нитрофенолят-иона в течение эксперимента.

координаты реакции становится ясным из рис. 18, в котором координата реакции, показанная пунктирной линией, представляет собой низкоэнергетический путь реакции от $A-B$ к $B-C$ как функцию изменения расстояний $A-B$ и $B-C$. Эта контурная диаграмма показывает, что расстояние $B-C$ уменьшается с образованием связи с C , а расстояние $A-B$ возрастает

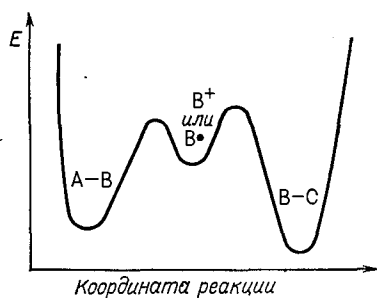


Р и с. 17. Энергетические кривые диссоциации молекул $A-B$ и $B-C$ и реакции $A-B$ с C с образованием $B-C$ без полной диссоциации.

до величины, при которой уже не может существовать эффективное связывание. Если реакция протекает через механизм образования карбониевого иона

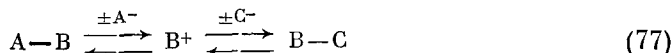


Р и с. 18. Контурная диаграмма, показывающая, что координата реакции (-----) является самым низким энергетическим путем от $A-B$ к $B-C$; точечные линии представляют энергетические контуры метастабильного иона карбония или радикала.



Р и с. 19. Координата реакции, протекающей через метастабильное промежуточное соединение — либо ион карбония либо радикал.

или радикала, в котором B полностью отделяется от A , прежде чем прореагирует с C [схема (75) или (77)], координата реакции должна проходить через



энергетическую ложбину для карбониевого иона или радикала, на рис. 18 показанную точечными линиями. Такая реакция должна обнаруживать провал на диаграмме переходного состояния, соответствующий метастабильному соединению (рис. 19).

Большое достижение теории переходного состояния заключается в том, что она позволяет использовать при изучении скоростей реакции почти все подходы, приложимые к исследованию равновесий, рассматривая переходное состояние как химическую частицу, существующую в некотором псевдоравновесии с исходными соединениями [схема (76)]. Скорость реакции зависит от «концентрации» переходного состояния, распад которого в продукты реакции происходит с трансмиссионным коэффициентом κ , близким к 1,0. Наблю-

даемая константа скорости k может быть описана псевдоравновесной константой образования переходного состояния из реагирующих веществ $K^\ddagger$ по уравнению

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} K^\ddagger, \quad (78)$$

в котором k_B — константа Больцмана, h — постоянная Планка.

Псевдоравновесная константа $K^\ddagger$ представляет собой, так же как и другие равновесные константы, отношение активности продукта (переходного состояния) к активности реагирующих веществ [уравнение (79)]. Поскольку

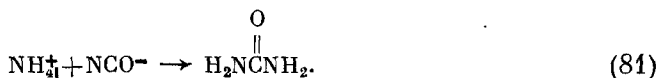
$$K^\ddagger = \frac{a_{TS}}{a_A a_B} = \frac{C_{TS}}{C_A C_B} \frac{f_{TS}}{f_A f_B} \quad (79)$$

принято, что скорость зависит от концентрации, а не от активности переходного состояния и в уравнение скорости входят концентрации реагентов, скорость можно представить уравнением (80), в котором отношение коэффициентов активности $f_A f_B / f_{TS}$ описывает отклонение от идеальности переходного состояния по отношению к реагентам. Это соотношение существенно облегчает обсуждение влияния растворителя, солей и других факторов на коэффициенты активности, приводящих к изменению скорости. Часто можно

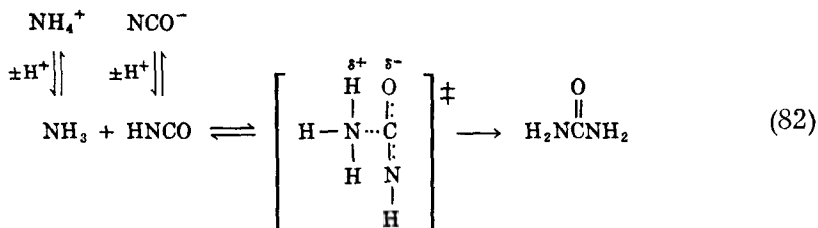
$$v \sim C_{TS} = K^\ddagger C_A C_B \frac{f_A f_B}{f_{TS}} \quad (80)$$

предсказать такие эффекты, анализируя природу реагирующих веществ и предполагаемого переходного состояния и имея представление о стабилизирующем или дестабилизирующем влиянии солей и растворителей на переходное состояние.

Для примера обсудим хорошо известную реакцию аммонийного и цианатного ионов с образованием мочевины [схема (81)]



Одно время механизм этой реакции был предметом широкого обсуждения физико-химиков. Речь шла о том, протекает ли эта реакция непосредственно через взаимодействие цианатного и аммонийного ионов или она включает предварительный перенос протона с образованием свободного аммиака и циановой кислоты, которые затем реагируют с константой скорости k' , давая мочевины [схема (82)]



Можно легко показать, что уравнения скорости для этих двух механизмов одинаковы, константы скорости связаны между собой через константы ионизации реагентов [уравнения (83) и (84)]. Однако к этому выводу можно прий-

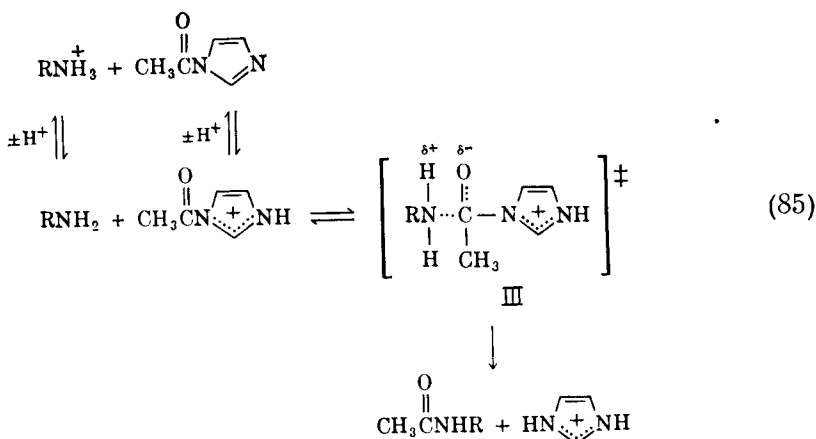
$$v = k[\text{NH}_4^+][\text{NCO}^-] = k'[\text{NH}_3][\text{HNCO}] = k' \frac{K_{\text{NH}_4^+}}{K_{\text{HNCO}}} [\text{NH}_4^+][\text{NCO}^-], \quad (83)$$

$$k = k' \frac{K_{\text{NH}_4^+}}{K_{\text{HNCO}}}. \quad (84)$$

ти и более простым рассмотрением, основанным на том, что стехиометрический состав и заряд переходных состояний для этих двух механизмов одинаковы, так что эти механизмы должны приводить к одному и тому же уравнению скорости и являются кинетически неразличимыми.

Оценить влияния солей и растворителей на эту реакцию можно исходя из этих двух механизмов путем раздельного рассмотрения эффектов на исходные соединения, на равновесия двух ионизационных стадий и на каждую кинетическую стадию. Было сделано много попыток различить эти два механизма путем исследования влияния солей и растворителей на наблюдаемую скорость [25]. Однако теория переходного состояния дает возможность сделать прямое заключение, что влияния солей и растворителей будет одинаковым для этих двух механизмов и выявление этих эффектов не может обеспечить способ для выбора механизма. В обоих случаях исходные соединения заряжены и любое разумное переходное состояние для каждого механизма [например, (82)] будет иметь тот же заряд или, более вероятно, меньший заряд, чем исходные соединения. Таким образом, добавление соли, по всей вероятности, будет стабилизировать (уменьшать коэффициент активности) исходные соединения больше, чем переходное состояние, что даст уменьшение скорости для любого механизма. Этот эффект наблюдается экспериментально. Добавление большинства органических растворителей будет дестабилизировать (увеличивать коэффициент активности) исходные соединения по сравнению с переходным состоянием и приведет к увеличению скорости, что также наблюдается экспериментально. Использование представления о переходном состоянии позволяет игнорировать все стадии между исходными соединениями и переходным состоянием. Вместо того чтобы обсуждать влияние изменений в условиях реакции на каждое равновесие и кинетическую стадию и затем пытаться суммировать их, чтобы предсказать эффект на общую скорость, достаточно обсудить только влияние на преобладающие ионные формы реагентов, относительно которых выражается наблюдаемая константа скорости, и на переходное состояние.

Те же упрощения приложимы к обсуждению влияния заместителей на скорость реакции. Для примера обсудим реакцию ацетилимидазола с серией замещенных аминов {схема (85)} [26, 27].



Преобладающими частицами в растворе при нейтральных значениях pH являются протонированный амин и незаряженный ацетилимидазол, однако активными частицами являются свободный амин и протонированный ацетилимидазол. Введение электронооттягивающего заместителя в амин должно приводить к увеличению наблюдаемой скорости. К этому выводу можно прийти, рассматривая каждую из двух стадий реакции: уменьшение pK замещен-

ного амина будет приводить к увеличению концентрации активного свободного амина, и это увеличение должно быть больше, чем уменьшение реакционной способности свободного амина, вызванного уменьшением основности. С другой стороны, можно заметить, что электронооттягивающий заместитель дестабилизирует исходное соединение больше, чем переходное состояние III, которое, почти определенно, имеет меньший заряд на атоме азота, чем исходный протонированный амин. Представление о переходном состоянии еще существеннее упрощает обсуждение результатов для более сложных реакционных схем.

1. ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ АКТИВАЦИОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ

Зависимость наблюдаемых констант скоростей от температуры часто подчиняется экспоненциальным уравнениям, в которых E_a — энергия акти-

$$k = PZe^{-E_a/RT} = Ae^{-E_a/RT}, \quad (86)$$

$$\ln k = -E_a/RT + \ln PZ, \quad (87)$$

вазии по Аррениусу, а PZ или A — «фактор столкновений». Энергия активации дается уравнением (88) и обычно определяется из уравнения (89) или

$$\frac{d \ln k}{dT} = -\frac{E_a}{RT^2}, \quad (88)$$

$$\log \frac{k_2}{k_1} = -\frac{E_a}{4,575} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right). \quad (89)$$

из наклона зависимости $\log k$ от $1/T$ (в градусах Кельвина), который равен $-E_a/2,303R$. Если эта зависимость нелинейна или если уравнение (89) не дает постоянного значения энергии активации в различных температурных областях, это значит, что либо реакция имеет заметную теплоемкость активации, либо с изменением температуры происходит изменение скорость определяющей стадии реакции.

«Фактор столкновений» PZ (или A) представляет собой так называемый температурно независимый фактор (хотя он не совсем независим от температуры) и имеет нормальное значение для реакции второго порядка в соответствии с теорией столкновений примерно $3 \cdot 10^{11}$ л/моль·с. В соответствии с этой теорией частота столкновений Z дается уравнением (90), в котором

$$Z = N_A N_B \left(\frac{d_A + d_B}{2} \right)^2 \sqrt{8\pi k_B T \left(\frac{1}{m_a} + \frac{1}{m_b} \right)}. \quad (90)$$

индексы А и В относятся к двум реагирующим молекулам А и В, N — число молекул в кубическом сантиметре, d — диаметр, m — масса реагирующих молекул. Вероятностный фактор C является поправочным параметром, который в простейшем случае может быть стерическим фактором, описывающим долю столкновений между А и В, происходящих с соответствующей ориентацией, ведущей к реакции. Трудности в интерпретации этой величины для реакций в растворе заключаются в том, что этот параметр объединяет много других переменных, помимо стерических факторов, и может даже иметь значение более 1. Экстремальный случай представляет денатурация яичного альбумина, которая имеет частотный фактор 10^{72} .

Использование представления о псевдоравновесии для образования переходного состояния позволяет приложить к скоростям реакций те же термодинамические параметры, которые применяют для описания обычного равновесия. Свободная энергия активации получается непосредственным логарифмированием выражения для наблюдаемой константы скорости вследствие прямого соотношения между константой скорости и равновесной константой

образования активированного комплекса [уравнение (91)]:

$$\Delta F^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger = -RT \ln \frac{kh}{k_B T}. \quad (91)$$

При 25°C $\Delta F^\ddagger = -1360 \log k + 17\,400$ кал/моль, если константы скоростей выражаются в с⁻¹. Свободная энергия активации имеет обычное соотношение с теплотой активации $\Delta H^\ddagger$ и энтропией активации $\Delta S^\ddagger$ [уравнение (92)]:

$$\Delta F^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger. \quad (92)$$

Соотношение $\Delta H^\ddagger$ и энергии активации по Аррениусу слегка различаются для разных типов реакций, однако для реакций в растворах они отличаются только на величину RT [уравнение (93)]. Энтропия активации связана с час-

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (93)$$

тотным фактором PZ или A , и ее можно вычислить из уравнения (94) или (95), а также из уравнений (91) и (92):

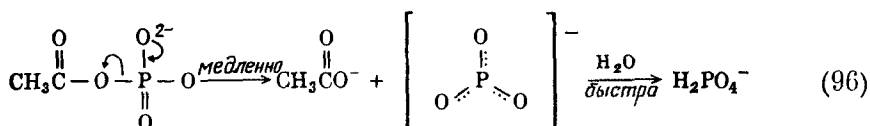
$$\Delta S^\ddagger = R \ln k - R \ln \left(\frac{ek_B T}{h} \right) + \frac{E_a}{T}, \quad (94)$$

$$\Delta S^\ddagger = 4,576 \log \frac{PZ}{T} - 49,203. \quad (95)$$

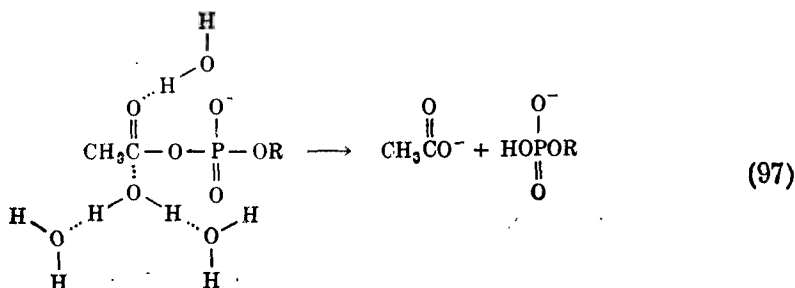
При вычислении термодинамических активационных параметров особое внимание следует обратить на быстрые равновесные стадии, особенно ионизации, предшествующие кинетической стадии, константа скорости которой исследуется. Так, константа скорости, вычисленная при использовании $a_{\text{ОН-}}$ или отнесенная к концентрации частиц свободного основания нуклеофила при значениях рН ниже его рК, должна учитывать каждую из этих величин при каждой исследованной температуре, так что измерения рН, величины K_w и константы ионизации каждого реагента должны быть получены при каждой температуре, чтобы при каждой температуре можно было вычислить концентрацию реагирующих частиц.

В терминах диаграммы переходного состояния (рис. 18) энтропию активации можно рассматривать как меру ширины участка энергетической седловины, через которую реагирующие молекулы переходят при достижении активированного состояния. Энтальпия активации является мерой высоты энергетического барьера, который должны преодолеть реагирующие молекулы, в то время как энтропия активации является мерой того, сколько молекул, достигших этой энергии, фактически реагируют. Энтропия активации отражает стерические и ориентационные требования, энтропию разбавления, концентрационные эффекты (зависящие от выбора некоторого стандартного состояния, в котором выражаются равновесные константы и константы скорости) и эффекты растворителя. При эквивалентности остальных особенностей мономолекулярные реакции будут иметь энтропии активации, близкие к нулю, поскольку для таких реакций обычно не существует концентрационных или ориентационных требований. Бимолекулярные реакции, которые описываются константами скоростей с размерностями, содержащими л/моль, будут иметь отрицательную энтропию активации в результате объединения двух молекул реагентов, находящихся в концентрациях 1 моль/л, в активированный комплекс и, вероятно, должны иметь еще большие отрицательные энтропии в результате стерических и ориентационных требований, включающих потерю поступательных и вращательных степеней свободы в переходном состоянии. Энтропия равновесной гидратации альдегида, которую можно рассматривать как модель взаимодействия воды и карбонильного соединения с образованием переходного состояния, составляет около -18 энтр. ед. (-75,6 Дж/моль·К). Это заметно более отрицательная величина, чем энтропия, равная -8 энтр. ед. (-31,6 Дж/моль·К), которая требовалась бы для ассоциации молекул реагента в стандартном молярном растворе.

Несмотря на некоторую неопределенность в количественной интерпретации, энтропия активации может служить удобным критерием для отличия мономолекулярных реакций от бимолекулярных (или полимолекулярных) в случае, если порядок реакции невозможно определить прямо из кинетики, как, например, для реакций, которые включают неизвестное число молекул растворителя [28]. Так, энтропия активации для реакции гидролиза дианиона ацетилфосфата равна +3,7 энтр. ед. (15,5 Дж/моль·К). Это согласуется с мономолекулярным механизмом, по которому на скорость определяющей стадии отщепляется ацетат-ион с образованием мономерного метафосфатного моноаниона, который реагирует с водой на последующей быстрой стадии [схема (96)]. Этот механизм не пригоден для реакции ацетилфенилфосфата,



который гидролизуется медленнее с энтропией активации, равной -28 энтр. ед. (-117,6 Дж/моль·К). Эта большая отрицательная энтропия, по-видимому, отражает требование ориентации нескольких молекул воды для нуклеофильной атаки карбонильной группы с облегчением переноса протона [схема (97)] [16].



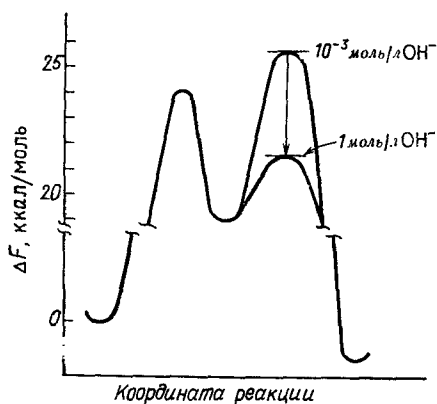
Этот же критерий можно использовать для интерпретации механизмов реакций, которые включают равновесный перенос протона до скорости определяющей стадии, таких, как гидролиз сахарозы [схемы (98) и (99)]:



Наблюдаемая энтропия активации для таких реакций включает энтропию предварительного переноса протона [схема (98)] энтропию разложения протонированного промежуточного соединения [схема (99)], что делает интерпретацию трудной, если энтропию стадии переноса протона нельзя непосредственно измерить или оценить. Тем не менее существует эмпирическая корреляция между энтропией активации и порядком реакции для некоторых кислотно катализируемых реакций: мономолекулярные A_1 реакции имеют значения $\Delta S^\ddagger$, близкие к нулю или положительные; бимолекулярные A_2 реакции ацил-соединений имеют значения $\Delta S^\ddagger$, которые обычно более отрицательны, чем -15 энтр. ед. (-63 Дж/моль·К), другие бимолекулярные реакции имеют значения $\Delta S^\ddagger$ в диапазоне от -5 до -15 энтр. ед. (от -21 до -63 Дж/моль·К); в некоторых случаях эти категории перекрываются [28].

Более прямой метод для определения порядка реакции может давать изучение *объема* активации [29, 30]. Объемы активации для стадий предва-

рительного переноса протона в кислотно катализируемых реакциях [например, (98)] обычно постоянны для данного типа ионизации, так что наблюдаемый объем активации можно легко скоррелировать с объемом активации для скорости определяющей стадии. Мономолекулярные реакции, по-видимому, имеют переходные состояния, одинаковые по размерам или большие, чем исходные соединения, поэтому объемы активации равны нулю или положительны. Можно ожидать, что переходное состояние для бимолекулярной реакции будет меньше по размерам, чем исходные соединения, поскольку реагирующие молекулы частично образуют



Р и с. 20. Диаграмма переходных состояний для реакции диметиламина с *p*-нитрофенилфосфатом, основанная на наблюдаемых константах скорости второго порядка при концентрациях ионов гидроксила 10^{-3} и 1,0 М. Свободные энергии активации основаны на наблюдаемых константах скорости, глубина впадины между энергетическими барьерами для двух стадий является условной [32].

ходным состоянием. Наоборот, если порядок реакции известен, энтропия и объем активации могут служить индикатором того, больше или меньше заряжено переходное состояние и требует ли оно большей или меньшей ориентации растворителя по сравнению с исходным состоянием.

Поскольку ионы оказывают структурообразующие и структуроразрушающие влияния на воду, можно было бы полагать, что полярные переходные состояния образуются с положительной энтропией активации. Это, по-видимому, не является общим правилом, возможно, потому, что упорядоченные молекулы воды вокруг образующегося заряда играют специфически каталитическую или сольватирующую роль. Этот и другие примеры показывают, что детальную интерпретацию механизмов реакций на основе термодинамических активационных параметров следует проводить с осторожностью.

При обсуждении механизмов реакций в водных растворах часто полезнее исследовать свободную энергию активации, чем энтальпию активации из-за трудностей в интерпретации последнего параметра, на которые несколько раз указывалось в этой книге. Двумерные диаграммы зависимости свободной энергии от координаты реакции и изменения в этих диаграммах при изменении условий реакции могут быть полезны для интерпретации механизмов реакций. Однако необходимо помнить, что свободная энергия активации включает концентрационно зависимые члены, так что можно внести ошибки в интерпретацию механизмов для стадий с различным порядком реакций или для экспериментальных ситуаций, в которых концентрация реагента

связь, так что объем активации должен быть отрицательным. Объем активации гидролиза [31] дианиона ацетилфосфата [схема (96)] равен $1,0 \pm 1,0$ см³/моль, в то время как объем активации гидролиза ацетилфенилфосфата [схема (97)] равен -19 ± 2 см³/моль.

Как объем, так и энтропия активации чрезвычайно чувствительны к влиянию растворителя. Ориентация молекул растворителя вокруг существующих или образующихся зарядов приводит к отрицательному изменению энтропии, и, сопровождаемая электрострикцией, приводит к отрицательному изменению объема. Эти эффекты могут быть даже больше эффектов, связанных с молекулярностью реакции, так что энтропию или объем активации можно использовать в качестве критерия молекулярности реакции только при условии, что существуют разумные предпосылки, указывающие на отсутствие большого различия в зарядах между исходными веществами и пере-

переменна. Далее, абсолютное значение стандартной свободной энергии активации зависит от шкалы концентрации, в которой выражены константы скорости. Эти концентрационные эффекты отражают вклад энтропии разбавления в свободную энергию. Свободную энергию активации обычно относят к стандартному состоянию 1 М концентрации реагентов и продуктов, входящих в уравнение скорости прямой и обратной реакций, включая ионы водорода и гидроксила.

Для некоторых целей полезно построить диаграмму свободной энергии активации для *наблюдаемой* константы скорости, которая изменяется при изменении условий реакции. Так, нуклеофильное замещение фосфата в *n*-нитрофенилфосфате диметиламином представляет собой двухстадийную реакцию с промежуточным образованием тетраэдрического продукта присоединения. Вторая стадия реакции подвержена катализу ионом гидроксила, так что в этом случае скорость определяющая стадия реакции — атака ароматического кольца — при уменьшении концентрации ионов гидроксила заменяется на разложение промежуточного продукта присоединения (рис. 20) [32]. Когда пользуются диаграммами такого рода для сравнения относительной роли различных путей реакции, важно быть уверенным, что порядок реакции и размерности, в которых выражены константы скорости, является одинаковым для сравниваемых путей реакции. Для диаграммы на рис. 20 в качестве стандартного состояния выбраны 1 М растворы для всех реагентов, *за исключением* иона гидроксила.

2. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ИНТЕРПРЕТАЦИИ МЕХАНИЗМОВ

Некоторые принципы, которые необходимо учитывать при использовании представления о переходном состоянии и диаграмм свободная энергия — координата реакции для интерпретации кинетики и механизма реакции, можно суммировать следующим образом:

1. Обычные кинетические методы можно использовать для нахождения общего заряда и стехиометрического состава переходного состояния, однако они не позволяют установить распределение заряда и организацию атомов в переходном состоянии. Уравнение скорости, согласующееся с механизмом, который включает реагенты, входящие в уравнение скорости, будет также согласовываться с любым химически разумным механизмом, включающим другие реагенты, находящиеся в быстро устанавливаемом равновесии с реагентами, входящими в уравнение скорости, если они имеют тот же общий состав и заряд.

2. При интерпретации влияния растворителей, солей, заместителей, а также при анализе термодинамических активационных параметров можно, и часто желательно, рассматривать только реагирующие вещества в растворе и переходное состояние, игнорируя все метастабильные промежуточные соединения. Существенно знать, что из себя представляют реагирующие вещества, т. е. их состояние ионизации, а также, существует ли заметная доля того или другого реагента в некоторой комплексной форме или промежуточном соединении. Невозможно провести различие между переходными состояниями одинакового состава и распределения заряда при исследовании влияния изменений в концентрации соли, растворителя и т. п.

3. Скорость определяющая стадия характеризуется наивысшей точкой на диаграмме свободная энергия — координата реакции. Если в реакции есть стационарное промежуточное соединение, скорость определяющая стадия обуславливается относительными скоростями распада промежуточного соединения на исходные вещества и продукты реакции, а не относительными скоростями его образования и распада (рис. 4, гл. 10).

4. Если в реакции существует нестабильное промежуточное соединение, весьма вероятно, что это промежуточное соединение похоже на переход-

ное состояние реакции и что факторы, которые влияют на стабильность промежуточного соединения, будут аналогичным образом влиять на переходное состояние.

5. Чем нестабильнее исходные соединения относительно продуктов реакции, тем раньше будет достигаться переходное состояние вдоль координаты реакции и тем больше оно будет походить на исходные соединения. Обратное утверждение имеет место для переходного состояния и продуктов реакции (рис. 9, 10 и 12, гл. 3). Пункты 4 и 5 создают основу для многих полезных корреляций скоростей реакций с равновесиями [33].

6. Диаграммы свободных энергий основаны на стандартных состояниях, и барьеры свободной энергии могут быть сравнимы только для сравнимых стандартных состояний. Так, энергетический барьер для некатализируемой реакции можно сравнивать с барьером кислотно катализируемой реакции при стандартном состоянии 1 М ионов водорода. Однако при сравнении можно использовать произвольные стандартные состояния; например, кислотно катализируемую реакцию при некотором значении рН можно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка и сравнивать с некатализируемой реакцией при том же значении рН.

7. Исходный уровень диаграммы переходное состояние — координата реакции является условным. Если сравнение производится между родственными реакциями, как в случае интерпретации влияния заместителей на скорости реакций, разрешается начинать с одинаковых энергий для всех исходных соединений, переходных состояний и продуктов, поскольку только энергетическая *разница* между исходными соединениями, переходными состояниями и продуктами определяется на опыте. Например, формально справедливо говорить о стабилизации заместителем переходного состояния (относительно реагирующих веществ) или дестабилизации исходных соединений (относительно переходного состояния), если введение заместителя вызывает ускорение реакции; обычно выбор между этими возможностями делается на основе химической интуиции.

8. Обратимые реакции должны протекать в обоих направлениях через одинаковое переходное состояние, так что уравнения скорости для прямой и обратной реакций должны отражать те же стехиометрический состав и заряд. Если для реакции существует несколько путей, энергии различных переходных состояний и доля всей реакции, которая протекает через каждое переходное состояние, являются одинаковыми для прямой и обратной реакций. Часто к неправильным выводам о механизме реакции приводит предположение, что при данных условиях для реакции важен только один путь в одном направлении, а обратная реакция протекает по другому механизму. Эти требования вытекают из принципа микроскопической обратимости или детального равновесия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frost A. A., Pearson R. G., Kinetics and Mechanism, 2d ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1961; Hammett L. P., Physical Organic Chemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 1940, chap. 4, p. 96; Friess S. L., Lewis E. S., Weissberger A. (eds.), Technique of Organic Chemistry, vol. VIII, parts I, II, 2d ed., Interscience Publishers, Inc., New York, 1963; Wiberg K. B., "Physical Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1964, chap. 3, p. 305; Amdur I., Hammes G. G., Chemical Kinetics: Principles and Selected Topics, McGraw-Hill Book Company, New York, 1966; King E. L., «How Chemical Reactions Occur.», W. A. Benjamin, Inc., New York, 1964.
2. Guggenheim E. A., Phil. Mag., 2, 538 (1926).
3. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Am. Chem. Soc., 90, 2622 (1968).
4. Jencks W. P., Gilchrist M., J. Am. Chem. Soc., 86, 1410 (1964).
5. Wilkinson R. W., Chem. Ind. (London), 1961, 1395.
6. Jencks W. P., Progr. Phys. Org. Chem., 2, 63 (1964).

7. Dändliker G., Trümpler G., *Helv. Chim. Acta* 37, 1661 (1954).
8. Kirby A. J., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3209 (1965).
9. Andon R. J. L., Cox J. D., Herington E. F. G., *J. Chem. Soc.*, 1954, 3188.
10. Higuchi T., Connor K. A., in «Advances in Analytical Chemistry and Instrumentations» (Riley C., ed.), vol. IV, Interscience Publishers Inc., New York, 1965, p. 117.
11. Mollica J. A., Jr., Connors K. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 308 (1967).
12. Jencks W. P., Gilchrist M., *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 104 (1966).
13. Pierre T. St., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 3817 (1968).
14. Edwards L. J., *Trans. Faraday Soc.* 46, 723 (1950).
15. Koshland D. E., Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2286 (1952).
16. Di Sabato G., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4400 (1961).
17. Hofstee B. H. J., *Science*, 131, 1068 (1960).
18. Bruice T. C., Donzel A., Huffman R. W., Butler A. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2106 (1967).
19. Garrett E. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 711 (1960).
20. Sizer I. W., Jenkins W. T., in «Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis» (Snell E. E., Fasella P. M., Braunstein A., Rossi Fanelli A., eds.), Pergamon Press, New York, 1963, p. 123.
21. Duffield R. B., Calvin M., *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 557 (1946).
22. Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 475 (1959).
23. Hand E., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3505 (1962).
24. Bender M. L., Heck H., *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 1211 (1967).
25. Frost A. A., Pearson R. G., *Kinetics and Mechanisms*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1961, part B, p. 307.
26. Jencks W. P., Carriuolo J., *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1778 (1960).
27. Jencks W. P., Carriuolo J., *J. Biol. Chem.*, 234, 1272, 1280 (1959).
28. Schaleger L. L., Long F. A., *Advan. Phys. Org. Chem.*, 1, 1 (1963).
29. Whalley E., *Trans. Faraday Soc.*, 55, 798 (1959).
30. Le Noble W. J., *Progr. Phys. Org. Chem.*, 5, 207 (1967).
31. Di Sabato G., Jencks W. P., Whaley E., *Can. J. Chem.*, 40, 1220 (1962).
32. Kirby A. J., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 3217 (1965).
33. Leffler J. E., *Science*, 117, 340 (1953); Hammond G. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 334 (1955); Leffler J. E., Grunwald E., *Rates and Equilibria of Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1963.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Авидин 263
Аденин, растворимость 305
S-Аденозилметионин 69, 125, 224—225
Аденозинтрифосфат 40, 95—97, 125, 228, 237—238, 245
Азетидин 83
Азиридин 83
«Айсбергов» образование 324
Аконитаза 176
Активация 243, 249—250
 косубстратами 237—238
 субстратом 237—238, 243
Активность ионов водорода и гидроксила 431
Актин 279, 280, 297
Аланин 122
Алкиламмониевые ионы 304
Алкилы, перенос, катализ 69
Алкогольдегидрогеназа 129
Алкоксиметилмочевина, гидролиз 369
Аллилмеркуриййодид, разложение 268—269
Аллостерические эффекты 224, 249—251
Альбумин
 денатурация 262, 447
 связывание анионов 276
 углеводородов 307—308
Альдегидгидраты 350, 371, 373
Альдегиды 131, 132, 203
 гидратация 26, 35, 147—162, 171—175, 371—372, 449
 окисление 129
 реакция с тиолами 156, 188—190, 203, 372—374
Альдолаза 43, 102, 106
Альдолная конденсация 101—107, 127, 374—376
Алюминий
 алкоголят 129
 хлорид 341
Амидины 188, 354—359, 403—406, 410
Амиды 294, 310, 410
 аминолиз 359—361, 401—404
 взаимодействие 341, 347
 водородная связь 260—263
 гидролиз 389—391
 как нуклеофильные реагенты 27
 реакция с альдегидами 370
Амиды — иод, продукты присоединения 332
Амин — боротрифторид, продукты присоединения 332
Аминоацилрибонуклеиновая кислота 16, 255
δ-Аминолевулиновая кислота 105
Аминомалонат 118—119
α-Аминофенилуксусная кислота 118
Аминоэтилацетат, аминолиз 391
Амины
 как катализаторы 99, 102—106
 комплексы с карбонильными соединениями 159
 нуклеофильность 82
 основность 149—150, 316
Амины, окиси 332, 342
Аммониевые ионы, сольватация 149—150
Ангидриды
 алкоголиз 379—385
 гидролиз 379—385
Анизол 122
Анилиды 412
 алкоголиз 320
 гидролиз 181, 389—390, 412
Анилин 125, 334, 369—371
 возбуждение 337
Анилин — динитрохлорбензол, комплекс 334
Аниона поле, сила 287
Анионный центр 274
Анионообменные смолы 276
Анионы жирных кислот, димеризация 308
Антипирен 378
Антителя 227, 303, 332
Анхимерное содействие 15
Аргон, растворимость 207, 310
Арилокситрифенилсиланы 143
Аспарагиновые пептиды 27
Аспартат-β-декарбоксилаза 121
Аспартаттранскарбамилаза 250
Аспирин 30, 432—433
 3,5-динитро-, 30
Атом водорода, перенос 212, 216
Атомные орбитали 340
АТФ 40, 95—97, 125, 228, 237, 238, 245
Ацетали 88
 гидролиз 172, 183—185, 371, 411
Ацетальдегид 79, 102, 156, 212, 350, 370, 374
 гидратация 147—148, 162, 171—175
Ацетат-ион, водородная связь 256
Ацетилацетон 171
 гидролиз 407
 енолизация 306
N-Ацетил-L-гексагидрофенилаланинамид 316
Ацетилглицин, этиловый эфир 235
N-Ацетилглюкозамин 238—239
Ацетилимидазол 61—64, 139—142, 397, 403
 аминолиз 446
 реакция с тиолами 399
Ацетилимидазолий, катион, гидролиз 382
Ацетилмалонаты 410
S-Ацетилмеркаптоэтаноламин, аминолиз 188, 398—401

- Ацетилпиридиний, ион 442—443
 О-Ацетилсалициламид 27
 Ацетилсалицилат 84
 О-Ацетилсерин 64
 N-Ацетилсериамид 64—65
 Ацетилтетраглицин, этиловый эфир 262—263, 276, 294, 347
 N-Ацетилтирозин-*n*-нитроанилид 51
 N-Ацетил-L-триптофан, 47
 метиловый эфир 47
 n-нитрофениловый эфир 47
 О-Ацетилуридин 16
 N-Ацетил-L-фенилаланинамид 316
 Ацетилфенилфосфат 449—450
 Ацетилфосфат 68, 84, 109, 433, 449—450
 Ацетилхолин 274
 Ацетилхолинэстераза 244, 274—275
 Ацетоацетатдекарбоксилаза 275
 1-Ацетокси-4-метоксипиридиний-катион 84
 Ацетоксихинолинсульфокислота 34
 Ацетон 91, 100, 165, 205
 Ацетонитрил, водородная связь 270
 Ацетоуксусная кислота, 33, 100—101,
 α, α -диметил-, 99
 Ацилтиамин 109, 111—112
 Ацилфосфаты 109, 130, 132, 371
 Ацилхимотрипсин 75
 Ацилцианиды 111, 132
 гидролиз 407
- Бария апатит 40
 Беджера правило 264
 Белки
 глобулярные 309
 денатурация 262, 279—281, 310, 328, 447
 диссоциация 278—281
 осаждение 278—284, 293—297
 растворимость 278—281, 293—297
 стабильность 308
- Белок вируса табачной мозаики, полимеризация 323
 Бензальацетофеноны 375
 Бензальдегид 38
 как катализатор 35
 Бензамид, гидролиз 390
 Бензгидридендиметиламмониевый ион 157
 Бензгидриденметиламин 377
 Бензгидрол 204
 Бензилиденанилины, гидролиз 369, 413
 Бензилиденбензиламин 166
 Бензилиден-1,1-диметилаэтиламин 156
 Бензилметилсульфид 39
 Бензилметилсульфоксид 39
 Бензоиларгинин, этиловый эфир 235
 Бензоилацетон, енолизация 306
 Бензоиновая конденсация 38
 Бензойная кислота, растворимость 312
 Бензойные кислоты 247
 Бензойный ангидрид 167
 Бензокаин, гидролиз 307
 Бензол 206
 взаимодействия 316
 высаливание 281, 290
 коэффициент активности 282, 290
 растворы 322
 теплота смешения 316
 Бензол — иод, комплекс 336
- Бера закон, отклонения 305
 1,1-Бинафтил 241
 Биотин 263
 Бифторид-ион 209, 255—256, 268
 Боратный буфер 353
 Бора трифторид 341
 Боргидрид 100, 104—105, 124, 368
 Борная кислота 150
 Брёнстеда соотношения 73, 144—152, 161, 189, 193, 214—215
 для алкоголиза эфиров 381
 для амиолиза эфиров 396
 отклонения 147
 для реакций присоединения к карбо-
 нильным соединениям 162
- Бром 341
 как окислитель 134
 Бром — ацетон, комплекс 341
 Бромзамещенный пируват 106
 Бромирование 122
 Бутадиен, полимеризация 312
трет-Бутанол — вода, смеси 320
 Бутан, растворы 322
трет-Бутил-N-нитрокарбамат 240
трет-Бутилхлорид, сольволиз 337
 Буфер 432
 Быстрого смешивания методы 243
- Валентное колебание 199, 208—209
 δ -Валеролактан 261
 Валил — АМФ 238
 Ван-дер-Ваальса силы 25, 289, 290, 307, 314—318, 321—322, 324, 339, 347
 Ванилин 66, 378
 Виниловые эфиры, разложение 215
 Винштейна Y значения 291, 337
 Витамин B₁₂, кофермент 125
 Витамин E 133
 Витамин K 133
 Внутреннее давление раствора 301, 318
 Вода
 активность 301
 водородные связи 324—325
 гидратация 282—283
 молярный объем 327
 «структура» 207, 234, 276, 297—301, 304, 318—329, 450
 температура максимальной плотности 327
 теплота плавления 324
- Водородные связи 254—272
 «ароматический» характер 271
 воды 324, 325
 в окиси дейтерия 219
 в полинуклеотидах 306
 изотопный эффект 216—217
 квантовая природа 269, 270, 325, 341
- Высаливание 280—282, 290—297, 300—301
 белков 279, 293—297
 неполярных растворителей 290
 «Высокоэнергетические» соединения 132
 Вюрстера синий катион — радикал 343, 345
 Вязкость 206, 298—300, 325—326
- Газы, гидраты 319
 α -Галогензамещенные кетоны 94
 Галоидалкилы, растворимость 207
 Гаммета σ -, ρ -корреляции 360—361
 Гаптены 277, 303

- Гексаметилбензол 333
 Гексан — циклогексан, равновесие 26
 Гексозамин-6-сульфат 40
 Гексокиназа 23, 228, 230, 231
 Гемоглобин 243
 высаливание 295
 диссоциация 293, 297
 связывание 308
 Гетерогенный катализ 40, 41, 242
 Гибридизация 204
 Гидразин 82, 150, 391
 Гидратации число 298
 Гидратация
 ионов 283—287
 карбонильных соединений 26, 35, 147, 162, 171—174, 371—372, 407, 448
 Гидрид-ион 129—130, 210, 216
 Гидроксамовые кислоты 86, 91, 130, 270, 359—360
 Гидроксиаминолиз 51, 53, 359—360, 398, 401—405
 Гидроксиаммониевый ион 149
 Гидроксиламин 87, 90, 91, 130, 351—353, 359—360, 367—368, 377, 398, 401—402, 427—428, 437—442
 Гидроксильная группа как катализатор 28, 90, 254, 255
 Гидроксиметиламины 149—150
 Гидрофобная связь 234, 263, 303, 304, 307—309, 323—324
 Гидрофобности параметр π , 308
 Гидрофобные силы 289, 303—329
 Гидрохинонфосфат 133
 Гиперконъюгация 205—206
 Гипохлорит 91—92, 126
 Гистидаза 123
 Гистидин, дезаминирование 123
 Глиоксальная кислота — глиоксалат натрия, комплекс 268
 Глиоксилаза 130
 Глицеральдегид-3-фосфат 106
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 43, 130, 243
 Глицин 117, 198, 212
 Глутаматдегидрогеназа 243, 279
 Глутатион 67, 131
 Глюкоза 228, 230, 231, 233
 мутаротация 37, 163—165, 171
 Глюкозиды см. Ацетали
 Глюкозо-6-фосфат 60, 127
 Гомосерин 125
 Гофмейстера ряд 278, 281, 288
 Грюнвальда — Винштейна Y значения 291, 337
 Гуанидин гидрохлорид 262, 279, 294, 310
 Гугенгейма метод 421—422
 «Дативная» связь 342
 Дауэкс-2 276
 Двусмысленность кинетическая 152—163
 Деальдолизация 102, 104, 109
 Дебая — Хюккеля теория 292, 435
 Дегидрогеназы 218
 5-Дегидрохинат 127
 Дезоксирибонуклеиновая кислота см. Нуклеиновые кислоты
 Дейтерометанол 264
 Декарбоксилазы 43
 Декарбоксилирование 98—101, 104, 117, 119, 121, 122, 125, 197
 Денатурация
 белков 262, 279—281, 310, 328, 447
 ДНК 279, 292, 293, 295, 305, 324
 Деформации 224—251
 Джонса — Доула уравнение 299
 Диалкилпиримидиновая кислота 215
 Диацетиламины, гидролиз 389
 Диацетоновый спирт 102
 Дибензоилэтилены 375
 2,6-Дигалогенбензальдегиды 407
 9,10-Дигидро-3,4,5,6-добензофенантрен 241
 9,10-Дигидро-4,3-диметилфенантрен 206
 Дигидролипоевая кислота 143
 Диизопропилхлорфосфат 88
 Дикарбоновые кислоты, водородная связь 256
 β -Дикетоны, енолы 272
 N,N-Диметилацетамид 341
 N,N-Диметилбензамид 390
 комплекс с иодом 341
 1-(N,N-Диметилкарбамил)-пиридиний хлористый 84
 Диметилксалоацетат 101
 Диметилсульфоксид 80
 Диметилцистамин 131
 Диметилформамид 80, 133, 326
 Диметилфосфат 240
 2,4-Динитротолуол 332
 2,4-Динитрофенилацетат 277, 426
 ϵ -Динитрофениллизин 303
 Динитрохлорбензол 333, 353
 Ди- n -пропилмалонат, моноанион 259
 Диоксан 300, 326
 Диоксиацетонфосфат 105
 1,2-Диолы, водородная связь 270
 Дипольные взаимодействия 314, 315
 Дипольные моменты 204
 Дисмутация 129
 Дисперсионные силы 289, 314—318, 324, 329, 339, 347
 Диссоциация полимеров 293
 2,3-Ди- m -бутилатная кислота 258
 Дифенилимидазол хлористый, гидролиз 404—405
 Диффузионно контролируемые реакции 49, 157—159, 188—190, 210—212, 313
 Диффузионно контролируемый перенос протонов 169—173, 215, 260, 400
 Диффузия, коэффициент 325
 Дихлорамин 126
 см. Дихлорфенилпрофосфаты 39
 Диэлектрическая проницаемость 246, 257, 286, 290, 310, 327, 337
 воды и окиси дейтерия 206
 Диэлектрическая релаксация 298, 324—327
 Диэлектрическое насыщение 286
 Диэтиламин — иод, комплекс 339
 Диэтилацетилмалонат 406—407, 408
 Диэтилацетилэтилмалонат 406, 407
 Диэтилмалонат 111
 ДНК 279, 305, 306
 Додецилсульфат натрия 311
 Донорно-акцепторные взаимодействия 332—347
 Енамин 95, 103—105, 109, 113, 121
 Енолизация 27, 102, 103, 106, 142, 165, 184, 197, 209, 306

- Желатина** 276, 279, 293
«Жесткие» лиганды 78
- Завершение реакции** 420—422
«Замка и ключа» модель 228
- Заряд**
в активном центре 226
плотность 287, 292, 298
- Заряженные группы макромолекул** 292—293
- o-Изобутирилбензойная кислота**, 27
Изолейцил-РНК-синтетаза 238
Изомеризация 166, 167, 227, 241, 243
Изосбестическая точка 296
Изотопное распределение 213
Изотопный обмен 437; см. также **Обмен водорода**, **Обмен кислорода**
Илид 107, 111
Имид 27
Имидазол 36, 39, 61—64, 69, 74, 118, 139—142, 177, 212, 363—364
Имидаты см. **Имидоэфиры**
Имидофосфат 133
Имидоэфиры 391—394, 399—402, 413
 аминолиз 354—359, 402—404, 441—442
 гидролиз 175, 364—365, 391—394, 397—402
Имины 152—157, 192
 гидролиз 367—371
 присоединение углеродных соединений 378
 реакция с аминами 377
Ингибирование продуктом 49, 51, 245, 442—443
 субстратом 49
Индуктивные эффекты дейтерия 204
Индукции период 243
Индукцированного соответствия теория 224, 229—230, 234, 242
- Иод** 341
 активация 39, 132
 комплексы 338
 растворимость 207
Иод — бензол, комплекс 334—335
Иод-крахмальные комплексы 332, 340
Иодопсин 227
Иод — пиридин, комплекс 339—340
Ион-дипольное взаимодействие 295—296
Ионизация 353, 366, 430—434, 439
Ионная сила 293
Ионные пары 277, 283, 286, 287, 296, 304—305
Ионный радиус 283—288, 298
Ионов связывание с белками 275—277, 304
Ионообменные смолы 276, 279, 287, 295
Ион-сольватирующая способность 337
Ионы ртути 342
- Кадмий, ион** 288
Кальций, апатит 40
Канницаро реакция 129
Карбагидраза 35, 151, 219
Карбанионы 95, 98, 103, 107—110, 116, 171, 211, 212, 385, 410
Карбобензоксиглицин, эфиры 49
Карбокислоты 147—149, 198, 200, 209, 211
 реакция с альдегидами 374—375
 Карбоксигемоглобин, растворимость 293
 Карбоксильная группа — карбоксилат-ион, комплексы 268
 Карбоксипептидаза 243
 n-**Карбоксифенилацетат** 29, 432—433
 Карбоксифосфорная кислота, эфиры 16
 Карбониевые ионы 74, 183—184, 204, 205, 239, 275, 444
 Карбонильные соединения, комплексы с аминами 159
 Карбоновые кислоты, ионизация 246
 Каротеноид — протеины 227
 Каталитические константы 140—141
 Катехин 89
 Катехина моноэфир бензойной кислоты 28
 Квадрупольные взаимодействия 284, 339
 Кетали 411
 Кетен 119
 α -Кетоглутарат, полуальдегид 106
 2-Кето-3-дезоксид-Л-арабинат 106
 2-Кето-3-дезоксид-6-фосфоглюкональдолаза 235—236
 2-Кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконат 105, 106
 β -Кетоислоты 99
 Кетонизация 128
 Кетоны
 гидролиз 406—408
 реакции с тиолами 408—409
 Δ -3-Кетостероидизомераза 168—169, 170—171, 237
 Кислород 93
 Кислотность в окиси дейтерия 201—203, 218—219
 Кислоты, этерификация 384
 Клатраты 312—314, 324
 Кобальт как катализатор 97
 Когезионная энергия 289—296, 301, 318, 328
 Колебания деформационные 199, 203, 209
 Коллаген 279
 Компенсация 247—248
 Комплекс, образование 308, 354, 427—428
 Конденсация углерод — углерод 66, 374—379
 Константы равновесия, определение 428, 436
 Контактное поглощение переноса заряда 336
 Конформационные изменения 219, 309
 определяющие скорость 49
 циклодекстринов 313
 Концентрационный эффект 23
 Кооперативные взаимодействия 250
 Координата реакции 443—444, 451—452
 Координационная связь 343
 Коричная кислота, дибромид 100
 Корреляции между свободными энергиями 70, 160
 Корреляции структура — реакционная способность 159—163, 178, 334, 361—364, 380
 Косовера Z значения 291, 337
 Кофеин 307
 Коэнзим Q 133
 Коэффициенты активности 281—282, 287, 290—296, 301, 308
 амидных групп 295—297
 оснований нуклеиновых кислот 305—306
 переходных состояний 445
 солей 286

- Коэффициенты распределения 307—308
Красители цианиновые 305
 ассоциация 305, 317, 324
Крахмал, гидролиз 278
Крахмал — иод, комплексы 332, 340
Критическая концентрация мицеллообразования 309
Ксантозин-5'-фосфатаминаза 250
Ксенон, фториды 341
- Лайнуивера — Берка зависимость 333, 428, 434
Лактатдегидрогеназа 243
Лактоза 263
Лактоны 20, 129, 175, 364—366, 371, 391
Лед 36—37, 298, 319, 324, 325
Лейдин, *n*-нитрофениловый эфир 35
Лизоцим 58, 182—184, 238—239, 243
Лиотропный ряд 278—279, 281, 288
Липовая кислота 109, 143
Липоилдегидрогеназа 45
Литий фторид 207
Лондона силы 289, 314—318, 329, 339, 347
Льюиса кислоты 91, 92, 125, 134
Льюисфераза 237
- Малеилпируват 67
Малеиновая кислота 257—260
Макромолекулы, физическое состояние 292—297
Максимальная скорость 250
 изотопный эффект 217—218
 ферментативная специфичность 228—235
- Манниха реакция 378—379
Мевалоновая кислота, пирофосфат 125
Меркаптоальбумин 276
«Мерцающие» кластеры 324
Металлопротеины 239
Металлы, ионы как катализаторы 34—35, 95—98, 101—118
Металлы, комплексы 239, 342
Метан, растворы 320—321
Метафосфат моноанион 97, 126, 133, 449
Метахромазия 324
 α -Метиламиноалонат 118
N-Метилацетамид 261
N-Метилбензамид 390
Метилглиоксаль 131
Метилгуанидин, ион 235
Метиленовые группы, растворение 321—323
5-10-Метилентетрагидрофолевая кислота, гидролиз 402, 411
N-Метилимидазол 63
Метилиодид 80
Метил-*o*-карбоксифенилацетат 430—433
Метилмеркаптоацетат 373
Метилнафтаат 307
Метилортобензоат, гидролиз 311
N-Метилпиридин-4-альдегид 119
4-Метилпиридин — иод, комплекс 339
5-Метилтетрагидрофолевая кислота 69
2-Метил- Δ^2 -тиазолин, гидролиз 399—401
2-Метил-2-фенилсукцинат 39
Метилформиат 391—393, 396
Метилциннамат, комплексы 346
Метилэтиленфосфат 143
Метионин 125
Метионин-активирующий фермент 245
- Метоксиаммониевый ион 150
N-Метоксикарбонилфенилаланин, *n*-нитро-фениловый эфир 38
Метоксиэтантиол 203, 212
Механизм «одного столкновения» 171—176, 182, 369—370, 383
Механизмы контроля 249—250
Микроскопическая обратимость 244, 249, 442, 452
Миоглобин, денатурация 346
Миозин-АТФ-аза 46
Мио-инозит-1-фосфат 127
Михаэлиса комплекс 427
Михаэлиса константа 51, 274
 изотопный эффект 219, 220—221
Мицеллы 308, 309—312, 323
Молекулярные комплексы 332—347
Молекулярные орбитали 340—345
 водородной связи 270—271
Молочная кислота 130
Мольные доли 17, 21, 288, 321
Мольные объемы 292, 327
Молярная рефракция 76, 93, 206, 317
Монополи 315
Морфолин 36, 66, 212, 393
Мочевина 260—263, 279
 гидролиз 13
 и гидрофобные связи 310, 328—329
 реакция с альдегидами 370
 синтез 445—446
- Муравьиная кислота 204
Мутаротация 163—165, 171
«Мягкие» лиганды 78
«Мягкость» 75—80, 81, 266
- Напряжение 25, 221, 224—251
Нафталины 333
Начальные скорости 423
Начальный «выброс» 45—46
Неионные детергенты 322
Неионные мицеллы 308
Нейтроны, дифракция 268
Неостигмин 275
Неполярная связь 303
Неполярные группы полимеров 294
Непродуктивное связывание 230—231, 234, 238, 239, 334, 336
«Несвязывающий» резонанс 335
Никотинамидадениндинуклеотид 126
 комплексы 345—347
Нитрамид, разложение 150
Нитрит 92
Нитроароматические соединения, комплексы 332
3-Нитро-4-ацетоксибензосульфат 277
Нитроацетон 408
2-Нитроацетофенон, гидролиз 408
n-Нитробензальдегид 158
Нитрометан 67, 378
Нитрон 157, 175
2-Нитропропан 198, 200
Нитростиролы, гидролиз 376
n-Нитрофенилацетат 61, 71, 79, 80, 82, 86, 91, 381
 аминолиз 79, 307, 396
 гидролиз 310, 312, 442—443
n-Нитрофениловые эфиры, аминлиз 307, 396—397
o-Нитрофенилоксалат 98

- n*-Нитрофенилфосфат 73—74
 аминолиз 73—74, 84, 277
 Нитрофенол 247
 Нитрофенолятный ион, связывание с α -циклодекстрином 313
 Нуклеиновые кислоты, денатурация 279, 293, 295, 305, 317, 324
 водородные связи 306
 физическое состояние 293
 Нуклеозидгексозодифосфаты 127
 Нуклеозиддифосфокиназа 54
 Нуклеофильное ароматическое замещение 333, 353
- Обмен водорода 166—169, 176, 197, 211, 212
 Обмен кислорода 48, 197, 240, 350, 379
 Обратимость 244—246
 Обратимые реакции 435—436
 Обращение конфигурации 58
 Объем активации 382, 449—450
 Объем раствора 292, 328
 Овальбумин 279
 «Однонаправленный» катализ 245
 Озазоны 271
 Озон 242
 Окислительная активация 39, 128—134
 Окислительно-восстановительный потенциал 75—80, 239
 Окислительное фосфорилирование 132, 133
 Окислительный катализ 125—128
 Окись дейтерия, растворы, кислотность 218
 О-Оксибензофеноны 260
 2-Оксиметилбензойная кислота 26
 о-Оксиметилфенол 32
 Оксими 66, 92, 113, 152, 157, 175, 351—353, 357, 367—370, 427—428, 437—442
 3-Оксипиридин-4-альдегид 133
 α -Оксипиридин 164
 2-Октилфенилсульфон 211
 Олефины
 изомеризация 67—68
 полимеризация 41
 Олефины — серебро, комплексы 332, 342
 Оранжевый
 бутиловый 37
 метиловый 37
 пропиловый 37
 этиловый 37
- Ориентационные эффекты 22, 24
 Ортоэфиры, гидролиз 215, 311, 384, 411
 Осаждение 278—281, 293—297
 Основания нуклеиновых кислот 305—306
 316, 317, 319, 324, 346
 Основность 287
 влияние на алкоголиз эфиров 380—381
 влияние на аминолиз эфиров 395—396;
 см. также Брёнстеда соотношение
 Осциллирующие ферменты 248—249
- Папаин 43, 49—50, 65, 244
 Парциальная мольная энтропия 299—300
 Парциальные молярные объемы 292, 327
 Пенициллин 36
 Пепсин 228
 Пептиды
 взаимодействие с ароматическими соединениями 347
 водородная связь 260—263
 Переиминирование 377
- Перекись водорода 93, 125, 372
 Перенос фосфатной группы 64, 68, 69, 73—74, 89—90, 95—97, 134
 Переходные состояния
 аналоги 236
 ассиметричное 207
 коэффициент активности 311, 445—446
 нелинейное 210
 рК в мицеллах 311—312; см. также Ионизация
 Пикриновая кислота, кислотность 315—316
 Пинаколиновая перегруппировка 210
 «Пинг-понг» кинетика 54
 Пиперональ 66
 Пиридин, загрязнения 423
 Пиридин
 ассоциация 428
 водородная связь 264, 266
 Пиридин-2-альдегид 35
 Пиридин-4-альдегид 35, 86, 87
 Пиридин-2-альдоксим 35
 Пиридин-бензойная кислота, комплексы 269
 Пиридиновый иодид 310, 335, 337
 Пиридин-иод, соединения 332, 339
 Пиридин, N-окись 91
 Пиридин — флаavin, комплексы 332, 346
 Пиридоксаль 66, 112—122, 125, 272
 α -Пиридон 164
 Пирофосфат 101, 125, 132, 133, 237
 Пиррол 105
 Пируват 27, 106—110, 119, 122, 124, 427—428
 Поверхностное натяжение 289, 291, 296, 318
 влияние мочевины 328—329
 Поверхностный слой 289
 Поглощение ультразвука 286
 Поли-5-(6)-винилбензимидазол 32
 Поливинилимидазол 277—278
 Поливинилпиридин 277—288
 Поливинилпирролидон 308—309
 Полигалидные ионы 340
 Полиглицин 40
 Полиглутаминовая кислота 242
 Полинуклеотиды 292
 денатурация 279, 292, 295, 305, 317—318, 324, 328
 Полиоксиметилен 242
 Полистиролсульфоновая кислота 278
 Полифосфаты 125
 Полицитидиловая кислота 306
 Полость 318, 329
 Полуацетали 129
 Полутиацетали 129—131, 156, 188, 189, 203, 374, 388
 Поляризуемость 75—80, 82, 88, 93, 206, 266, 289, 315—318
 дейтерийсодержащих соединений 221
 Порядок реакции 17, 418—424, 430, 449—450
 Потенциал группы 255
 Потенциал ионизации 77, 338, 343, 346
 Потенциальная энергия 246
 «Правило реагирующей связи» 163
 «Правило сольватации» 163
 Принцип неопределенности 200
 Принцип Паули 271
 Пролин 66, 124, 236

- Пролинрацемаза 236
 Пролинредуктаза 124
 Промежуточные соединения 157—159; см. также Тетраэдрическое промежуточное соединение
 β -Пропиолактон 70, 75
 Пространственные затруднения 83—84, 200, 212, 225, 448
 Протона перенос 187, 192, 198, 200, 209, 211—213, 216, 267, 368
 Профлавин, связывание с активным центром 48
 Псевдопервого порядка реакции 423, 425—437
 Психофуранин 250
 pH 354—359, 430—434
 pD, измерение 218
 Равновесие, влияние дейтериевого изотопного эффекта 201—203, 218, 219
 Растворимость 281—282, 290, 307—308 белков 278—280, 292—293 оснований нуклеиновых кислот 305—306 солей 284—287 углеводов 310, 320—323
 Рацемизация 116, 166, 206, 236, 241
 Реакции второго порядка 17, 418, 422—423, 424 обмена 57—61, 437 (см. также Обмен кислорода, Обмен водорода) первого порядка 418—422, 425—437
 Реакции замещения 224—227
 общий кислотный катализ 143
 Регулирование ферментативной активности 249—250
 Резина 242
 Резонанс 85, 335, 344 водородной связи 270
 Рентгеновских лучей дифракция 309
 Рибоза, ацилированные производные 254
 Рибонуклеаза 219, 279 денатурация 310
 Рибофлавин, восстановление 143
 Рибофлавин — нуклеозид, комплексы 346
 Родопсин 227
 Ротамеров распределение 18, 21
 Ртутные электроды 290
 Салицилальдегид 260
 Салицилат моноанион 259
 Салицилат натрия 279
 Салицилсульфат 31
 Салицилфосфат 31
 Самодиффузия воды 298
 Саркозилпептид 40
 Сахароза, гидролиз 198, 201, 449
 Свейна — Скотта уравнение 70, 77, 161
 Свободная энергия 246—248 активации 447—451 переноса 308, 310 растворения 320—322
 Связь, трехатомная, двухэлектронная 271
 Семикарбазид 158, 361, 369—371
 Семикарбазоны, образование 65—67, 358—359, 360—362, 369—371
 Семихиноны 345, 346
 Серебро — олефин, комплекс 332, 342
 Серин 64, 65, 75, 117
 Серин-трансоксиметилаза 122
 Серы двуокись 122
 Сеченова уравнение 281
 Силикагель 37
 Синглетное состояние 343, 345
 Скорость определяющая стадия 211, 367, 380—382, 391, 439, 451
 Согласованные реакции 189
 Согласованный катализ 163—176, 369, 405
 Соединения включения 39, 312—314, 319, 324
 Солевые эффекты 155, 165, 274—301, 382, 435, 446
 Солей растворимость 285—287
 Сольватация 24, 80—83, 93, 149—150, 246—248 ионов 80, 207
 Сольватированный протон 145—146, 203, 214
 «Сопровождения» механизм 167
 Специфический кислотный катализ 147
 Специфический основной катализ 165
 Специфичность ферментов 224, 228—233
 α -Спираль 260
 Спираль — клубок переход 242
 Спирты ацилирование 38, 379—385 растворы 322
 Сродство к электрону 343, 346
 Стандартные состояния 17, 21, 288, 451—452
 Статистические эффекты 146—147
 «Стекинг» — взаимодействие 306, 316
 Стереоспецифический катализ 38, 40
 Стерический эффект дейтерия 206, 221
 Стероиды агрегация 317 взаимодействия 316, 324
 «Структура» растворителя см. Вода, «структура»
 Структурные перегруппировки 85
 «Структуроразрушающие» ионы 206, 298, 326, 328
 Субtilазин 43
 Субъединицы 243, 250, 251
 Сукцинал-КоА-ацетоацетил-КоА-трансфераза 54—61
 Сукцинилтиокиназа 43, 64
 Сульфгидрильный реагент 242
 Сульфиды, окисление 39
 Сульфит 69, 87, 92, 122, 134 реакция с альдегидами 370
 Сульфоксиды 39
 Сульфониевый ион 225
 Текучесть 299
 Температура плавления 293
 Температурного скачка метод 243
 Теноилтрифторацетон 408
 Термодинамические активационные параметры 447—451
 Теплоемкость 328
 Теплота см. также Энтальпия растворения 284 смешения 316 сублимации 316
 Тетракилламмониевые ионы 283, 292, 300—301, 327, 328

- Тетрабутиламмониййодид 286
 Тетрабутиламмонийхлорид 286
 Тетра-*трет*-бутилиндифенол 212
 Тетрагидрофосфатная кислота 158
 Тетраглицин, метиловый эфир 40
 Тетраметиламмоний бромид 282, 291, 292, 294
 Тетраметиламмоний иодид 286
 Тетраметилгидразин 150
 Тетраметилглюкоза 163—164
 Тетраметилгуанидин, гидрохлорид 262
 Тетраметилмочевина 262
 Тетраметилянтарная кислота 15—16, 25
 Тетраметилфенилендиамин, комплекс 332, 343
 Тетрацианэтилен 333, 343
 Тетраэдрическое промежуточное соединение 351—366, 379, 391—394
 Тетраэтиламмоний хлорид 327
 Тетроксан 242
 Тиазолины, гидролиз 399—401
 Тиамин 69, 107—112
 Тиаминаза 69
 δ -Тиовалеролактон 212
 Тиоловые эфиры 109, 130, 132, 410
 аминолиз 65, 188, 396, 398—401
 гидролиз 385—389, 396, 442
 резонанс 385
 свободная энергия 132, 385
 Тиоловые эфиры фосфорной кислоты 132
 Тиолы 79, 82, 87, 111, 129, 130
 замещение 240—241
 реакция с альдегидами 156, 188—189, 203, 372—374
 Тиомочевина, реакция с альдегидами 370
 Тионин, димеризация 324
 Тиосемикарбазоны 413
 Тиоэтанол 373
 Тиоэфиры 39, 225—226
 Титрование аминов формальдегидом 150
 Тищенко реакция 129
 Трансаминирование 116, 118, 122
 Транскетотлаза 109
 Трансфизация 377
 D-Треозо-2,4-дифосфат 130
 Треонин 117, 121, 219
 Треонинсинтетаза 219
 Триалкиламины — трехфтористый бор, комплексы 342
 Три-N-ацетилглюкозамин 263
 Три-*трет*-бутилфенол 22, 212
 Тригонеллин 224
 Триодид 332, 340
 Триметиламин, водородная связь 270
 Триметиламин, N-окись 90, 122
 Триметиламмониевый ион 211
 Триметилendisulfид 240
 Тримолекулярная реакция 159, 192
 2,4,7-Тринитрофлуоренил-*n*-толуолсульфонат, сольволиз 333
 Тринитрофлуорон 241
 Триоксан 242
 Триpletное состояние 260, 343, 345
 Трипсин 43, 235
 Триптофан 117
 Тритий, изотопный эффект 200, 220
 Трифосфат 245
 Трифторперуксусная кислота 125
 Трифтортиоуксусная кислота, этиловый эфир, гидролиз 386—389
 Трифторуксусная кислота — трифторацетат натрия, комплекс 268
 Трифторуксусная кислота, этиловый эфир 350, 351, 379
 алкоголиз 383
 Трихлоруксусная кислота, кислотность 315
 Триэтилендиамин 68, 84, 426
 Тромбин 43
 Туннельный эффект 191, 200, 207, 209, 267
 Углеводородные цепи, дисперсионное взаимодействие 315
 Углеводороды, растворы 320—323
 Углерода двуокись, гидратация 151
 Углерод, основность 86—89
 Уголь активированный, адсорбция изотопов водорода 220
 Угольная кислота 150, 151
 Уксусная кислота, водородная связь 256
 Уксусный ангидрид 20, 21, 26
 Уравнения стационарной скорости 437—443
 Уреаза 13
 Уридиндифосфатгалактозо-4-эпимераза 126
 Урокановая кислота 124
 Фактор столкновений 447
 Фенантрен 333
 Фенилацетат 20, 423
 аминолиз 198, 212, 394—397, 400, 429—430
 гидролиз 246
 метоксиаминолиз 400
 Фенилацетилен 149
 Фенилбензоат, гидролиз 385
 Фенилглютараты 18
 Фенилендиамин, комплексы 343, 345
 N-Фенилминолактон 175, 364—366, 391, 398
 Фенилметилкетен 38
 Фенил-*n*-нитросалицилат 27
 Фениловые эфиры, гидролиз 233
 β -Фенилпропионовая кислота 306
 Фенилсалицилат 27, 30
 Фенилсукцинаты 18
 β -Фенилтриетиламмониевый ион 216
 Фенилуксусная кислота — фенилацетат, комплекс 268
 Фенол 204
 взаимодействие с амидами и белками 347
 водородная связь 264—266, 270
 ионизация 246
 комплексы 217
 перенос протона 191
 Фицин 43
 Флавинаденидинуклеотид 134
 Флавин, комплексы 332, 345—347
 Флавиновые семихиноновые радикалы 346
 Флавины, восстановление 143, 346
 Формальдегид 86, 122—123, 129, 150, 153, 306, 350, 379
 Формальдегид, реакция с гидроксиламином 401—402
 Формамиды, гидролиз 188, 403—406
o-Формилбензойная кислота, эфиры 36
 3'-Фосфаденозин-5-фосфосульфат 40
 Фосфогидразиды 132

- Фосфоглюкозоизомеразы 168, 170—171
 Фосфоглюкомутаза 43, 54
 Фосфогомосерин 121, 219
 Фосфенол пировиноградной кислоты —
 гексоза трансфосфоорилаза 43, 64
 Фосфоенольная форма пировиноградной
 кислоты 101
 Фосфокетоллаза 110
 Фосфониевой кислоты эфиры 134
 Фосфора пентахлорид 340
 Фосфоресценция 260
 Фосфоорилаза 23
 Фосфоорилаза сахарозы 54, 57
 Фосфорной кислоты амиды 65, 68, 123,
 126, 424
 Фосфорной кислоты эфиры, гидролиз 84,
 143, 187, 240, 371
 Фосфороимидазол 64
 Фотоизомеризация 227
 Франка — Кондона принцип 344
 Фталевая кислота 39
 моноэфиры 20
 Фталевый ангидрид 39
 Фторид-ион 68, 81, 88
 Фторированные углеводороды 88
 Фтористый водород, олигомеры 216
n-Фторолуол 205
 Фторфосфат 68, 88
 Фумарилпируват 67
 Фумаровая кислота 257, 258
 Функции распределения 246
- Хаммонда постулат 159—163
 Хелаты 263, 288
 Хелдена интерпретация 427
 соотношение 245
 Хендерсона — Хассельбалха уравнение 431,
 434
 Хлораль 350
 Хлорамин 82
 Хлоранил 332, 333, 343
n-Хлорбензальдегид 147, 157
 4-Хлорбутанол 143
 Хлорирование 209
 Хлорэтанол, гидролиз 33, 37
 Химотрипсин 43, 45—48, 51—52, 177—182,
 231, 233—235, 243, 244
 взаимодействие с ароматическими суб-
 стратами 316, 317
 ингибирование углеводородами 307—
 308
 триметилацетил 46
 Холестерин 125
- Цетилтриметиламмоний бромистый 311
 Цианатный ион 445
 Циангидрин 38, 110, 132
 Цианид 84, 100, 105, 110—111, 132
 реакция с альдегидами 370
 присоединение к иминам 378
 Цианистый водород 38
 Цианокетендиметилацеталь 215
 Циклогексамиллаза 39
 Циклогексанон 378
 Циклогептатриен 216
 Циклодекстрины 39, 313
 Циклопентадиолмоноацетаты 255
 Циклопентилтозилат 204, 205
- Циклопропандикарбоновая кислота 215
 Цистатионин 117, 121, 125
 Цистеин 117, 125
цис-транс-Изомеризация 67—68
 Цитохром-*b*₅-редуктаза 218
 Цитратконденсирующий фермент 218—219
- Шерсть, связывание анионов 276
 Шиффа основания 66—67, 99, 100, 103,
 104, 112—114, 116, 121, 123, 152; см.
 также Имины
- Щавелевоуксусная кислота
 декарбоксилирование 100—101
 кетонизация 165
 Щелочная фосфатаза 43, 243, 336
- Эдвардса уравнение 76
 Эдестин 279
 Эластаза 43
 Электрические свойства твердых тел 345
 Электроды стеклянные 287
 использование в окиси дейтерия 218
 Электронодефицитные связи 339
 Электроны неспаренные 342—345
 Электроотрицательность 77
 Электропроводность 286
 Электростатические взаимодействия 84,
 257, 258, 274—301
 Электрострикция 291, 292, 328
 Элиминирование 117, 120, 121, 122, 125,
 208
- Энергия
 активации 171, 209, 447—451
 гидратации 283—288
 кристаллической решетки 284
 нулевой 198—200, 201—203, 206, 207—
 210, 212, 216
 связи 86
 связывания 227—229, 231—232, 234,
 237—239, 245
 сольватации 283
 Энтальпия 246—248, 276, 301, 318
 активации 13, 25, 234, 241, 447, 448
 ассоциации 323, 324
 взаимодействия 316, 323
 водородных связей 264
 растворения 320—321
 Энтропия 246—248, 276, 289, 301, 309,
 318
 активации 234, 235, 382, 447—448
 ассоциации 323, 324
 разбавления 321
 трансляционная 289
 Эпимеризация 126
 Эстераза 43, 233—235
 Этилацетат 20, 111, 205
 Этилбензимидаз 354—358
 гидролиз 398
 реакция с гидроксиламином 402
 Этилдихлорацетат 144
 Этилендиаминтетрауксусная кислота 263,
 288
 Этиленфосфат, гидролиз 240
 1-Этил-4-карбометоксипиридиниййодид 335
 Этил-*m*-нитробензимидаз 354—358
 Этилхлорацетат, гидролиз 212
 Этил-*цис*- α -циано- β -*o*-метоксифенилакри-
 лат 67

Эфиры 410, 411

алкоголиз 379—385

аминолиз 307, 349, 364, 391—401,
425—426, 429, 430гидролиз 307, 346, 362, 379—385, 426,
430—432

основность 383

реакции с аминами 17, 25

— с имидазолом 363, 364

— с карбоксильным ионом 17, 30

свободная энергия гидролиза 255

Эффекты

 α - 91—94растворителя 155, 246—248, 435, 445—
446, 450— в окиси дейтерия 202—203, 206—
207, 213, 216, 218, 221

электронной корреляции 316

Ядерный магнитный резонанс, спектры
306

Янтарный ангидрид 20, 21, 26

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	7
Предисловие автора	8
Принятые обозначения	10
ЧАСТЬ ПЕРВАЯ. МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА	11
Литература	14
Глава 1. Катализ сближением	15
А. Внутримолекулярные реакции и анхимерное содействие	15
1. Примеры	15
2. Интерпретация	21
3. Энтальпия и энтропия	25
4. Другие внутримолекулярные реакции	27
Б. Вынужденное сближение	32
1. Лед	36
В. Специфичность	37
Г. Гетерогенный катализ	40
Литература	41
Глава 2. Ковалентный катализ	43
А. Введение	43
Б. Экспериментальные доказательства образования ковалентных фермент-субстратных промежуточных соединений	44
1. Наблюдение за образованием и исчезновением промежуточного соединения	45
2. Распад с одинаковой скоростью общего промежуточного соединения, образовавшегося из разных субстратов	48
3. Распределение промежуточного продукта между двумя реакциями распада с постоянной общей скоростью	51
4. Распределение общего промежуточного соединения между двумя реакциями распада с постоянным отношением концентраций обоих продуктов	52
5. Кинетика	53
6. Реакции обмена и переноса	56
7. Реакции обмена и ингибирования	59
В. Нуклеофильный катализ	61
1. Имидазольный катализ переноса ацильных групп	61
2. Нуклеофильные группы в ферментах	64
3. Реакции переноса карбонильной группы	65
4. <i>цис-транс</i> -Изомеризация	67
5. Перенос фосфатной группы	68
6. Реакции переноса алкильной группы	69
Г. Нуклеофильная реакционная способность	69
1. Основность	71
2. Поляризуемость, окислительно-восстановительный потенциал	75
3. Сольватация	80
4. Пространственные затруднения	83
5. Электростатические эффекты	84
6. Резонансная стабилизация и структурные перегруппировки	85
7. Прочность связи с углеродом	85
8. Внутримолекулярный общекислотный катализ	89
9. α -Эффект	91
Д. Электрофильный катализ	94
1. АТФ и металлы	95
2. Декарбоксилирование β -кетокислот	98
3. Альдольная конденсация	101
4. Тиаминпирофосфат	107
5. Пиридоксаль	112
6. Другие примеры	122

Е. Окислительный катализ	125
Ж. Окислительная активация	128
Литература	134
Глава 3. Общий кислотно-основной катализ	139
А. Экспериментальные проявления	139
1. Гидролиз ацетилимидазола	139
2. Другие примеры	142
Б. Соотношение Брёнстеда	144
1. Статистические поправки	146
2. Отклонения от соотношения Брёнстеда	147
В. Двусмысленность в установлении центра катализа	152
Г. Согласованный общий кислотно-основной катализ, реакции «одного столкновения» и обмен протона с растворителем	163
1. Мутаротация глюкозы	163
2. Бензилиденбензиламин	166
3. Обмен протона с растворителем	167
4. Процессы переноса протона, контролируемые диффузией	169
5. Механизм «одного столкновения» и согласованный механизм	171
Д. Ферментативные реакции	176
1. Аконитаза	176
2. Химотрипсин	177
3. Лизоцим	182
Е. Механизм общего кислотно-основного катализа	184
1. Перенос протона к атому и от атома углерода	185
2. Реакции переноса протона к атомам и от атомов кислорода, азота и серы	186
3. Стабилизация переходного состояния общим кислотно-основным катализом	192
Литература	194
Глава 4. Изотопные эффекты	197
А. Введение и теория	197
Б. Равновесия в воде и в окиси дейтерия	201
В. Вторичные изотопные эффекты [20]	203
1. Изменение частот колебаний связей с нереагирующими атомами	204
2. Индукционные эффекты	204
3. Гиперконъюгация	205
4. Стерические эффекты	206
5. Влияние растворителя	206
Г. Величина кинетических изотопных эффектов	207
1. Асимметричные переходные состояния	207
2. Роль деформационных колебаний	209
3. Нелинейные переходные состояния	210
4. В переходном состоянии протон не находится на вершине энергетического максимума	210
5. Вторичные изотопные эффекты	213
Д. Общие выводы о изотопных эффектах водорода в химических реакциях	216
Е. Изотопные эффекты в ферментативных реакциях	217
1. Влияние изотопного замещения на максимальную скорость реакции	217
2. Влияние изотопного замещения на константу Михаэлиса	220
Литература	221
Глава 5. Напряжения, деформации и конформационные изменения	224
А. Катализ реакций замещения	224
Б. Проявление специфичности ферментов в максимальных скоростях	228
1. Теория индуцированного соответствия	229
2. Гипотеза непродуктивного связывания [11—16]	230
3. Теория напряжения или деформации	232
В. Некоторые приложения теории напряжения	233
1. Эстераза и химотрипсин	233
2. Трипсин	235
3. 2-Кето-3-дезоксиглюко-6-фосфоглюканальдолаза	235
4. Ингибирование аналогами переходного состояния	236
5. Активация косубстратами	237
6. Лизоцим	238
7. Химические реакции	240
Г. Скорости конформационного изменения	242
Д. Обратимость	244

Е. Энтропия, энтальпия и свободная энергия	246
Ж. Осциллирующие ферменты	248
З. Механизмы контроля и аллостерические ферменты [70]	249
Литература	251

ЧАСТЬ ВТОРАЯ. СИЛЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ 253

Глава 6. Водородная связь 254

А. Доказательства образования водородной связи в водном растворе	254
1. Эффекты ускорения реакций	254
2. Межмолекулярная водородная связь	255
3. Внутримолекулярная водородная связь	256
4. Белки, пептиды и мочевины	260
Б. Свойства водородной связи	264
В. Модели водородной связи	269
Литература	273

Глава 7. Электростатические взаимодействия 274

А. Макроскопические проявления ионных взаимодействий	274
1. Связывание ионов	274
2. Концентрированные растворы солей	278
Б. Теоретическая интерпретация	282
1. Прямые ионные взаимодействия	282
2. Концентрированные растворы солей	290
Литература	301

Глава 8. Гидрофобные взаимодействия 303

А. Примеры	304
1. Взаимодействия ионов	304
2. Основания нуклеиновых кислот	305
3. Влияние на скорости реакций	306
4. Оценка величины гидрофобных сил	307
5. Мицеллы	309
6. Клатраты, или соединения включения	312
Б. Теоретическая интерпретация	314
1. Дисперсионные силы Ван-дер-Ваальса—Лондона	314
2. Гидрофобное связывание	318
Литература	329

Глава 9. Донорно-акцепторные взаимодействия и комплексы с переносом заряда 332

А. Макроскопические проявления взаимодействий	332
Б. Классические КИЗ в спектроскопии	334
В. Родственные явления и длинные электронодефицитные связи	339
Г. Неспаренные электроны и радикалы	342
Д. Донорно-акцепторные взаимодействия и перенос заряда в биохимии; флавинные комплексы	345
Литература	347

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ 349

Глава 10. Реакции карбонильной и ацильной групп 349

А. Методы установления механизма	349
1. Тетраэдрические промежуточные соединения и скорость определяющая стадия	351
2. Смена скорость определяющей стадии с изменением рН	354
3. Смена скорость определяющей стадии при изменении концентрации общесновного и общекислотного катализатора	358
4. Смена скорость определяющей стадии при изменении структуры реагентов	360
5. Распад промежуточного продукта, возникающего после скорость определяющей стадии по ряду направлений	364
Б. Специфические реакции	366
1. >C=O и RNH_2	367
2. >C=O и RONH	371
3. >C=O и RSH	372

4. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \end{array}$ и $\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{HC} \end{array}$	374
5. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=N-} \end{array}$ и RNH_2	377
6. $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=N-} \end{array}$ и $\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{HC} \end{array}$	378
7. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCOR}' \end{array}$ и HOR''	379
8. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCSR}' \end{array}$ и HOR''	385
9. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCNR}'_2 \end{array}$ и HOR''	389
10. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCSR} \end{array}$ и $\text{H}_2\text{NR}'$	398
11. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCNHR}' \end{array}$ и $\text{H}_2\text{NR}''$	401
12. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCC} \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \end{array}$ и HOR'	406
13. $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{RCC} \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \end{array}$ и HSR'	408
Таблица рассмотренных механизмов	410
Литература	414
ЧАСТЬ ЧЕТВЕРТАЯ	417
Глава 11. Практическая кинетика	417
А. Скорости, константы скорости и порядок реакции	418
1. Реакции первого порядка	418
2. Завершение реакции	420
3. Реакции второго порядка	422
4. Начальные скорости	423
5. Порядок реакции	424
Б. Использование констант скоростей псевдопервого порядка	425
1. Параллельные реакции первого порядка	425
2. Нелинейная зависимость k_{obs} от концентрации другого реагента	427
3. Влияние pH и ионизация реагентов	430
4. Солевые эффекты и влияние растворителей	435
5. Обратимые реакции	435
6. Изотопный обмен при равновесии	437
В. Уравнения стационарной скорости	437
1. Ингибирование первым продуктом в двухстадийной реакции	442
Г. Приложения теории переходного состояния	443
1. Термодинамические активационные параметры	447
2. Основные правила интерпретации механизмов	451
Литература	452
Предметный указатель	454

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛИ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110 ГСП, 1-й Рижский пер., 2, издательство «Мир».

В. ДЖЕНКС

Катализ в химии и энзимологии

Редактор *Г. М. Мануйлова*

Художник *В. З. Казакевич*. Художественный редактор *Н. Г. Блинов*
Технический редактор *В. П. Сизова*

Сдано в набор 27/IV 1972 г. Подписано к печати 27/X 1972 г. Бумага № 1 70×108¹/₁₆=14,63 бум. л., 40,95 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 40,20
Изд. № 3/6170. Цена 4 р. 37 к. Зак. 0500.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2

Ордена Трудового Красного Знамени Московская типография № 7 «Искра революции» Главполиграфпрома Государственного комитета Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли,
г. Москва, Трехпрудный пер., 9